



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA-FAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**MATURAÇÃO FISIOLÓGICA E TAXA DE CRUZAMENTO NATURAL**  
**NA PRODUÇÃO DE SEMENTES DE *Capsicum* sp.**

**ELAINE VAZ JUSTINO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**  
**ABRIL/2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA-FAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**MATURAÇÃO FISIOLÓGICA E TAXA DE CRUZAMENTO NATURAL**  
**NA PRODUÇÃO DE SEMENTES DE *Capsicum***

**ELAINE VAZ JUSTINO**

**ORIENTADOR: WARLEY MARCOS NASCIMENTO, Ph.D**

**CO-ORIENTADOR: LEONARDO SILVA BOITEUX, Ph.D**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO: 61/2013**

**BRASÍLIA/DF**

**ABRIL/2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA-FAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**MATURAÇÃO FISIOLÓGICA E TAXA DE CRUZAMENTO NATURAL**  
**NA PRODUÇÃO DE SEMENTES DE *Capsicum***

**ELAINE VAZ JUSTINO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**APROVADA POR:**

---

**WARLEY MARCOS NASCIMENTO**, Ph. D (Embrapa Hortaliças - CNPH)  
(ORIENTADOR) CPF: 329.264.056-34 e-mail: warley.nascimento@embrapa.br

---

**RICARDO CARMONA**, Ph. D (Universidade de Brasília – UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 183.492.181-34 e-mail: rcarmona@unb.br

---

**MARÇAL HENRIQUE AMICI JORGE**, Ph. D (Embrapa Hortaliças - CNPH)  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 167.946.548-14 e-mail: marcal.jorge@embrapa.br

**BRASÍLIA/DF, 22 ABRIL DE 2013.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Vaz Justino, Elaine

Maturação fisiológica e taxa de cruzamento natural na produção de sementes de *Capsicum*. / Elaine Vaz Justino, orientação de Warley Marcos Nascimento. – Brasília, 2013.

128p.: il

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. *Capsicum*. 2. Maturidade fisiológica. 3. Capsaicina. 4. Marcador molecular. 5. Taxa de cruzamento natural. 6. Qualidade genética. 7. Polinização. I. Nascimento, W. M. II. Título. Ph.D.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

JUSTINO, E. V. Maturação fisiológica e taxa de cruzamento natural na produção de sementes de *Capsicum*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 128p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Elaine Vaz Justino.

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Maturação fisiológica e taxa de cruzamento natural na produção de sementes de *Capsicum*.

GRAU: Mestre

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

---

Elaine Vaz Justino

CPF: 923.181.346-34

Endereço: Colônia Agrícola Samambaia, chác. 146-b

CEP: 72.110-600 – Brasília/DF – Brasil

(61) 9819 0514 / (61) 8128 4584- e-mail: [elainevazjustino@hotmail.com](mailto:elainevazjustino@hotmail.com)

***Dedico***

*Aos meus pais, **Jaudival e Maria Lídia**,  
aos meus **irmãos** e ao meu filho **Ian  
Gabriel**, por todo amor, carinho e  
incentivo.*

## ***AGRADEÇO,***

Agradeço a Deus Pai todo poderoso; a Deus Filho, o justo, que morreu por nós e ressuscitou, e ao Espírito Santo, consolador, que habita em mim! Sem Jesus, sei que não valeria a pena, se não fosse Seu amor, misericórdia, conforto e capacitação eu não teria começado e muito menos chegado até aqui.

Muitas pessoas crêem que servir a Deus ou serem consideradas filhas de Deus significa não passar por circunstâncias difíceis e dolorosas. Servir a Deus significa viver acima das circunstâncias, passar por elas e ter o caráter moldado. Deus me deu forças através das pessoas que colocou ao meu lado durante toda essa trajetória. Por alguns instantes pensei em desistir, mas, uma força maior me empurrou para seguir em frente e aqui estou... Mestre em Agronomia pela Universidade de Brasília.

Ao meu orientador Dr. Warley Marcos Nascimento pelas valiosas dicas, ensinamentos e apoio durante todo o trabalho. Obrigada pela oportunidade e por contribuir na minha formação profissional.

Ao meu co-orientador Dr. Leonardo Silva Boiteux pela colaboração e apoio.

Ao professor Ricardo Carmona pelos admiráveis conhecimentos adquiridos e pelas sugestões para a melhoria do trabalho.

Ao examinador externo Dr. Marçal Henrique pela participação e colaboração.

Agradeço a minha maravilhosa equipe de trabalho do Laboratório de Sementes da Embrapa Hortaliças: Andrielle, Karlão, Jorge, Patrícia, Virgílio, Sr. Waldir, Sr. Lourenço, Sr. Elias. Meus queridos “irmãos”! Obrigada pelo carinho, prontidão, companheirismo, disposição para ajudar e acima de tudo, pela amizade. Este trabalho é nosso!

Agradeço ao Chico Bucha e José Getúlio do Laboratório de Melhoramento Vegetal da Embrapa Hortaliças, pela paciência, disposição e ensinamentos transmitidos.

À todos os amigos que fiz na Embrapa Hortaliças: chefes, pesquisadores, analistas, estagiários, bolsistas, equipe da limpeza e jardinagem.

Agradeço aos professores da Universidade de Brasília (UnB) pelos conhecimentos transmitidos de forma admirável. Agradeço também aos amigos que fiz: Jane, Ana Catarina, Ana Paula Arosio, Miguel, Flávia, Rafaela, Rodrigo, Daniel, Celso...

Agradeço ao Pesquisador Dr. Márcio Elias do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo apoio.

À Bruninha, minha ‘Anjinha’ que se colocou à disposição para ajudar no que fosse preciso, bem como a Ediene que me socorria sempre que precisava. Muito obrigada!!!

Agradeço aos meus pais, Maria Lídia e Jaudival, ao meu filho Ian Gabriel e aos meus irmãos, cunhados, cunhadas, sobrinhos e primos, pelo infinito amor e compreensão e pelo incentivo nos momentos mais difíceis. À vocês meu eterno amor!

Ao pai do meu filho, Roberto, pelo apoio e incentivo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, à Embrapa Hortaliças pela logística, supervisão e infra-estrutura disponibilizadas no desenvolvimento do trabalho e a Universidade de Brasília – UnB pelos conhecimentos adquiridos.

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho se concretizasse, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento. *Muito OBRIGADA!*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>5</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
2.1 Origem das pimentas.....	8
2.2 Características botânicas.....	8
2.3 Principais espécies domesticadas de <i>Capsicum</i> encontradas no Brasil.....	11
2.3.1 <i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>annuum</i> .....	11
2.3.2 <i>Capsicum baccatum</i> L. var. <i>pendulum</i> (Willd.) Eshbaugh.....	12
2.3.3 <i>Capsicum chinense</i> Jacquin.....	12
2.3.4 <i>Capsicum frutescens</i> L. ....	13
2.4 Importância nutricional.....	14
2.4.1 Potencial antioxidante das pimentas.....	16
2.4.2 Propriedades anticâncer e antimutagênica das pimentas.....	17
2.5 Importância para o Brasil.....	18
2.6 Mercado de sementes de pimenta no Brasil.....	20
2.7 Processo de desenvolvimento das sementes.....	21
2.7.1 Grão de pólen.....	21
2.7.2 Polinização.....	22
2.7.3 Fertilização e desenvolvimento da semente.....	23
2.8 Maturidade fisiológica.....	27
2.9 Produção de sementes de pimenta.....	29
2.10 Melhoramento genético de pimentas e pimentões.....	33
2.10.1 Cultivares de pimenta.....	35
2.11 Marcadores moleculares.....	36
2.12 Marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA.....	40
2.12.1 Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP.....	40
2.12.2 Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD.....	41
2.12.3 Microssatélites ou Simple Sequence Repeat – SSR.....	43
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 Geral.....	45

3.2 Específicos.....	45
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>62</b>
<b>Determinação da maturidade fisiológica de sementes de pimenta dedo-de-moça (<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>).....</b>	<b>62</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>63</b>
<b>ABSTRACT. ....</b>	<b>64</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>68</b>
2.1 Produção de sementes.....	68
2.2 Colorimetria de frutos (sistema L*a*b*).....	69
2.3 Teor de clorofila no pericarpo dos frutos.....	69
2.4 Comprimento longitudinal dos frutos.....	70
2.5 Teor de capsaicina nos diferentes estádios fisiológicos dos frutos.....	70
2.6 Teor de água.....	73
2.7 Massa de 100 sementes.....	73
2.8 Teste de germinação.....	73
2.9 Primeira contagem de germinação.....	74
2.10 Emergência de plântulas em casa de vegetação.....	74
2.11 Teste de envelhecimento acelerado.....	74
2.12 Delineamento experimental e análise estatística.....	75
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>

<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>97</b>
<b>Determinação da taxa de cruzamento natural e monitoramento da pureza genética de sementes de <i>Capsicum annuum</i> utilizando marcadores codominantes associados com a pungência dos frutos.....</b>	<b>97</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>98</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>100</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>105</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXOS CAPÍTULO I.....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXOS CAPÍTULO II.....</b>	<b>126</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Colorimetria pelo sistema L*a*b* em frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	77
<b>Figura 2.</b> Teor de clorofila em frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	78
<b>Figura 3.</b> Comprimento longitudinal (cm) dos frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	79
<b>Figura 4.</b> Visualização tridimensional dos picos dos diferentes capsaicinóides a 280 nm. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	79
<b>Figura 5.</b> Visualização tridimensional dos picos dos capsaicinóides obtidos na placenta dos frutos da cv. BRS Mari. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	80
<b>Figura 6.</b> Teor dos capsaicinóides (SHU) no pericarpo dos frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	81
<b>Figura 7.</b> Teor dos capsaicinóides (SHU) na placenta dos frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	82
<b>Figura 8.</b> Teor dos capsaicinóides (SHU) nas sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	84
<b>Figura 9.</b> Graus de umidade (%) de sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	85
<b>Figura 10.</b> Massa de 100 sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	86
<b>Figura 11.</b> Germinação (%) de sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	87
<b>Figura 12.</b> Primeira contagem de germinação (%) em sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	88

<b>Figura 13.</b> Emergência de plântulas (%) em sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	89
<b>Figura 14.</b> Envelhecimento acelerado (%) em sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	90

## CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do perfil de amplicons do marcador codominante derivado do locus de pungência <i>Pun-1</i> . Linha de corrida M = marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); Pic hom = Linhagens CNPH 990 e CNPH 2725 homozigotas para o locus <i>Pun-1</i> ; Doce = linhagens ‘CNPH 196’ e ‘CNPH 581’ sem presença de <i>Pun-1</i> ; Pic het = Linhagens CNPH 305-1 e CNPH 653-1 heterozigotas para o marcador <i>Pun-1</i> ; Sint pais 1, 2 e 3 = três repetições de bulks sintéticos misturando uma amostra de DNA de ‘BRS Garça’(pungente) com 15 amostras de DNA de ‘Magali R’; G = ‘BRS Garça’ (genitor masculino); M = ‘Magali R’ (genitor feminino); G1 a G6 = amostras de ‘BRS Garça’ e M1 a M10 = amostras de ‘Magali R’. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	109
<b>Figura 2.</b> Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do perfil de amplicons PCR dos marcadores codominantes derivados do locus de pungência <i>Pun-1</i> . Linha de corrida M = marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); G = ‘BRS Garça’ (genitor masculino); M = ‘Magali R’ (genitor feminino). A1 a A20; B1 a B20 e C1 a C6 = bulks misturando 16 amostras de DNA de ‘Magali R’ a partir de progênies obtidas de frutos fecundados naturalmente em condições de campo. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	110
<b>Figura 3.</b> Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do perfil de amplicons do marcador codominante derivado do locus de pungência <i>Pun-1</i> . Linha de corrida M = marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); G = ‘BRS Garça’ (genitor masculino); M = ‘Magali R’ (genitor feminino) seguidos do perfil de amplicons obtidos dos materiais em teste nas demais colunas. Família (progênie) F12-1 a F12-16; I10-1 a I10-8; I16-1 a I16-8. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	110

<b>Figura 4.</b> Plantas de pimentão ‘Magali R’ contaminadas com pólen de pimenta ‘BRS Garça’ como indicado pela análise com o marcador molecular codominante derivado do gene <i>Pun-1</i> . Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	111
<b>Figura 5.</b> Sementes oriundas de plantas de pimentão ‘Magali R’ contaminadas com pólen de pimenta ‘BRS Garça’ como indicado pela análise com o marcador molecular codominante derivado do gene <i>Pun-1</i> . Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	112
<b>Figura 6.</b> Taxa de cruzamento natural em plantas de pimentão ‘Magali R’ como indicado pela análise com o marcador molecular codominante derivado do gene <i>Pun-1</i> . Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	113
<b>Figura 7.</b> Taxa de cruzamento natural em sementes de pimentão ‘Magali R’ como indicado pela análise com o marcador molecular codominante derivado do gene <i>Pun-1</i> . Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	114

## ANEXOS

### CAPÍTULO I

<b>Anexo 1.</b> Campo de produção de sementes de pimenta cv. BRS Mari. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	120
<b>Anexo 2.</b> Colorimetria pelo sistema L* a* b*. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012....	120
<b>Anexo 3.</b> Aspectos da análise do teor de clorofila no pericarpo dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	121
<b>Anexo 4.</b> Mensuração do comprimento dos frutos de pimenta ‘BRS Mari’. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	121
<b>Anexo 5.</b> Extração dos capsaicinóides no pericarpo, placenta e sementes de pimenta ‘BRS Mari’. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	121
<b>Anexo 6.</b> Teste de germinação de sementes de pimenta. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	122
<b>Anexo 7.</b> Emergência de plântulas em casa de vegetação. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	122
<b>Anexo 8.</b> Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	122
<b>Anexo 9.</b> Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes no pericarpo de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 30 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	123
<b>Anexo 10.</b> Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes na placenta de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 30 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	123
<b>Anexo 11.</b> Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes nas sementes de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 30 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	124
<b>Anexo 12.</b> Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes no pericarpo de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 70 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	124

<b>Anexo 13.</b> Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes na placenta de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 70 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	125
<b>Anexo 14.</b> Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes nas sementes de frutos com 70 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	125

## **CAPÍTULO II**

<b>Anexo 1.</b> Genitores masculino e feminino. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	126
<b>Anexo 2.</b> Progenitores e <i>plug</i> de folha jovem. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013....	126
<b>Anexo 3.</b> Extração de DNA (método CTAB). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013....	127
<b>Anexo 4.</b> Aspectos da técnica de Polymerase Chain Reaction - PCR. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.....	127
<b>Anexo 5.</b> Layout da área. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012.....	128

## RESUMO GERAL

**JUSTINO, E. V. MATURAÇÃO FISIOLÓGICA E TAXA DE CRUZAMENTO NATURAL NA PRODUÇÃO DE SEMENTES DE *Capsicum*. Universidade de Brasília. Abril de 2013. Orientador: NASCIMENTO, W. M. Co-orientador: BOITEUX, L. S.**

A implantação de um campo de produção de qualquer espécie de planta propagada sexuadamente, como as pimentas do gênero *Capsicum* deve ser feita empregando sementes de alta qualidade. A qualidade é uma característica multifatorial representada pela soma dos atributos físicos, fisiológicos, genéticos e sanitários, através do qual as sementes expressam toda sua potencialidade em um determinado ambiente. A semente é, portanto, um insumo de grande proeminência no processo produtivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica e genética das sementes de espécies de *Capsicum* por meio, respectivamente de estudos relacionados com a determinação da maturidade fisiológica das sementes e com a taxa de cruzamento natural. O trabalho foi conduzido nas instalações do campo experimental e laboratórios de sementes, de pós-colheita, de melhoramento genético e de análise genômica da Embrapa Hortaliças Brasília-DF. Para a determinação da maturidade fisiológica das sementes foi utilizada a cv. BRS Mari (*C. baccatum* var. *pendulum*). As sementes foram obtidas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação, sendo aos 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 dias após a antese. Os frutos foram avaliados quanto ao teor de clorofila, teor de capsaicina, coloração e comprimento, e as sementes quanto ao teor de umidade, matéria seca, germinação, primeira contagem de germinação, emergência em casa de vegetação e envelhecimento acelerado. Para a determinação da taxa de cruzamento natural foi utilizado como genitor masculino a cultivar de pimenta (*C. annuum*) ‘BRS Garça’ e como genitor feminino o pimentão (*C. annuum*) ‘Magali R’. O primeiro fruto maduro do genitor feminino foi colhido e as sementes extraídas, secadas e embaladas para posterior análise molecular. Destas sementes, foram produzidas mudas em casa de vegetação e as folhas jovens coletadas para extração de DNA. A análise molecular foi realizada mediante o emprego da técnica de PCR usando *primers* específicos para um gene (*Pun-1*) associado com a pungência de frutos. De acordo com os resultados, a maturidade fisiológica das sementes de pimenta cv. BRS Mari ocorreu aos 70 dias após antese, onde os frutos apresentaram a coloração vermelha. Neste

estádio de desenvolvimento, a umidade das sementes foi de 39% e a germinação e emergência das plântulas de 88% e 77%, respectivamente. Notadamente, os picos mais altos da concentração de capsaicina foram observados nesta fase. O marcador específico para capsaicina mostrou-se eficiente para quantificar as taxas de cruzamento natural em condições naturais de Brasília. A taxa de cruzamento natural que ocorreu nas plantas e sementes foi de 10,8% e 1,2%, respectivamente. Estes resultados demonstram a utilidade desse marcador molecular na identificação da pureza genética das sementes bem como na manutenção, multiplicação de germoplasma e na produção de sementes comerciais de pimentas da espécie *C. annuum*. Além disso, nossos resultados reforçam a necessidade, nas condições brasileiras, de estabelecer sistemas de isolamento físico visando garantir a pureza (qualidade) genética de sementes de germoplasma de *Capsicum*.

**Palavras-chave:** *Capsicum*, maturidade fisiológica, capsaicina, marcador molecular, taxa de cruzamento natural, qualidade genética, polinização.

## GENERAL ABSTRACT

**JUSTINO, E. V. PHYSIOLOGICAL MATURITY AND NATURAL RATE CROSSING IN SEED PRODUCTION OF *Capsicum*. University of Brasilia. April 2013. Adviser: NASCIMENTO, W. M. Co-adviser: BOITEUX, L. S.**

The use of high quality seeds is an important issue to be considered in order to achieve a good stand establishment of field crops. Seed quality is a multifactor trait that represents the sum of the physical, sanitary, physiological and genetic, through which the seeds express all its potential in a given environment. The seed is thus an input of high importance in the production process. The objective of the present work was to evaluate the genetic and physiological quality of two *Capsicum* species in assays carried out to determine the physiological maturity of seeds as well as the rate of natural crossing. The experiments were carried out at the experimental fields and the laboratories from Embrapa Vegetables, Brasília, DF. The hot pepper ‘BRS Mari’ (*C. baccatum* var. *pendulum*) was used in the assays aiming to determine the physiological seed maturity. Seeds of this cultivar were obtained from fruits harvested at different maturity stages: 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 days after anthesis. Color, length, chlorophyll and, capsaicin content were determined on the fruits and seed moisture content, dry matter, germination, first count of germination, emergence under greenhouse conditions and accelerated aging were determined on the seeds. For the determination of the cross-pollination (outcrossing) rate under natural conditions, the hot pepper (*C. annuum*) ‘BRS Garça’ as used as male parent and the bell pepper (*C. annuum*) ‘Magali R’ as used as female parent. The first mature fruit of the female parent was harvested; the seeds were extracted, dried and packaged for subsequent analysis. Seedlings in the greenhouse were produced and the young leaves collected for DNA extraction. Molecular analysis was performed by using PCR assays with primers designed to target a gene (*Pun-1*) associated with fruit pungency. The physiological maturity of ‘BRS Mari’ seeds occurred at 70 days after anthesis, where the fruits showed red color. At this stage, seed moisture content was 39% and the germination and seedling emergence had 88% and 77% respectively. Notably, the highest capsaicin accumulation levels were observed at this stage. The specific marker molecular for fruit pungency was effective for quantifying natural outcrossing rates under natural conditions in Brasília-DF. The rate of cross-pollination determined at plant and

seed levels was 10.8% and 1.2%, respectively. These results indicated that this molecular marker may be helpful in the determining genetic purity of commercial hot pepper seed production. In addition, our results reinforce the notion that the physical isolation of the seed production fields is highly recommended under Brazilian conditions in order to preserve the genetic purity (quality) of *Capsicum* seeds.

**Keywords:** *Capsicum*, physiological maturity, capsaicin, molecular marker, natural outcrossing rate, genetic quality, pollination.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Capsicum* L. é representado por diferentes grupos varietais englobando desde os pimentões até as pimentas doces e picantes (RIBEIRO e CRUZ, 2002). O Brasil é um importante centro de diversidade do gênero *Capsicum*, pois em seu território encontram-se espécies de todos os níveis de domesticação (domesticadas, semidomesticadas, silvestres). Dentre as cinco espécies domesticadas, apenas *C. pubescens* não se encontra representada no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Levando em conta a aceitação e impressionante rapidez de difusão e utilização global, a pimenta-hortícola pode ser considerada um alimento do mundo moderno, ainda que dados arqueológicos mostrem o seu uso e consumo pelos povos nativos há milhares de anos (REIFSCHNEIDER, 2000). São denominadas hortícolas para diferenciá-las de outras pimentas, como a pimenta-do-reino ou pimenta-preta (*Piper nigrum* L., da família Peperaceae), a pimenta-rosa (*Schinus molle* L., da família Anacardiaceae) e a pimenta-da-jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl., da família Myrtaceae). Não apresentam parentesco entre si, todas se mostram com propriedades químicas distintas (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

As pimentas são amplamente difundidas entre as populações, que as utilizam como condimento, planta medicinal, hortaliça convencional e mais recentemente planta ornamental (NASCIMENTO *et al.*, 2006). São fontes de proteínas, glicídios, lipídeos, minerais e vitaminas A, C e E, além de conter em sua composição os alcalóides, denominados capsaicinóides, que atuam em várias áreas do corpo como antioxidantes que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres, prevenindo algumas doenças (SOUZA e SILVA, 1999). Esses benefícios foram descobertos pelos povos primitivos há milhares de anos e só agora estão sendo comprovados pela ciência.

Até pouco tempo, o cultivo de pimentas era considerado como atividade secundária; hoje sofreu grandes transformações para atender às demandas internas e externas do mercado consumidor, assumindo grande importância para o País. Isso se deve a agregação de valor ao produto, na forma de conservas, molhos, pós (páprica), flocos (pimenta calabresa), doces, geléias, embutidos, dentre outras (NASCIMENTO *et al.*, 2006). O cultivo de pimenta

apresenta-se como um segmento de grande importância social, realizado desde pequenos a grandes produtores, e se ajusta perfeitamente aos modelos de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústrias (REIFSCHNEIDER, 2000). O negócio de pimentas é um importante segmento do mercado agrícola brasileiro, com forte expressão na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. O agronegócio brasileiro de *Capsicum* é muito amplo e promissor, e vem se tornando um dos mais importantes entre as hortaliças (RUFINO e PENTEADO, 2006). Possui grande importância sócio-econômica, pois envolve diferentes segmentos, como cultivos para auto-consumo, desde pequenas plantações e fábricas artesanais caseiras, até a exportação de páprica por empresas multinacionais que competem no mercado internacional de especiarias e temperos. A crescente demanda do mercado tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas (doces e picantes) um dos mais importantes do país (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

As pimentas, com sua gama de cores, formas e pungência, fazem parte de valioso patrimônio genético da biodiversidade brasileira. Na década de 80, a Embrapa Hortaliças e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia iniciaram coletas e intercâmbio de pimentas de diferentes tipos (REIFSCHNEIDER, 2000). No mercado mundial de sementes de hortaliças, as solanáceas representam a família de maior importância, com cerca de 25% do faturamento mundial. No seu programa de melhoramento genético de solanáceas, a Embrapa Hortaliças desenvolveu diversas cultivares para processamento industrial e recentemente, disponibilizou algumas cultivares de pimenta para a agricultura familiar: ‘BRS Mari’, ‘BRS Moema’ e ‘BRS Seriema’. As cultivares ‘BRS Sarakura’, ‘BRS Garça’ e ‘BRS Mari’ foram caracterizadas morfológicamente por meio de 48 descritores estabelecidos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) e encaminhadas, em 2009, para o processo de proteção no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa, a partir de materiais do Banco de Germoplasma, está desenvolvendo pimentões e pimentas doces para páprica e pimentas picantes com resistência a doenças e com melhores características agronômicas e industriais.

Atualmente, a Embrapa recebe cooperação técnica e financeira de três projetos firmados em 2008: Macroprograma 2 da Embrapa, Projeto financiado pelo CNPq e o Contrato de Parceria em Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuários entre a Empresa Sakura-Nakaya Indústria de Alimentos Ltda. e a Embrapa, que têm as pimentas e os pimentões como

importantes matérias-primas (CARVALHO *et al.*, 2009b). O Banco de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças foi iniciado há 29 anos e dispõe de uma coleção de quase 3000 acessos, entre cultivares de polinização aberta, híbridos, populações de materiais cultivados, linhagens e materiais silvestres, representados principalmente pelas espécies domesticadas de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, provenientes de vários países e regiões brasileiras. É referência no Brasil e no exterior, pois é uma das maiores coleções em números de acessos e de variabilidade genética e, provavelmente, a única que possui espécies silvestres. A ampla variabilidade é verificada quanto à coloração, formação de fruto, aroma, picância (pungência ou ardume), resistência múltipla a doenças e arquitetura de planta ornamental. Fato esse que permite a seleção de genótipos superiores com potencial para diversos nichos de mercados, beneficiando tanto os pequenos agricultores como as grandes agroindústrias (CARVALHO *et al.*, 2009b).

A expressão fenotípica das características de interesse agrônomo, verificada por meio da avaliação agrônoma, é de fundamental importância para o melhorista de plantas (HIDALGO, 2003). O uso de técnicas moleculares é um instrumento aplicável importante para o estudo da diversidade genética de uma espécie e de características de uso em programas de melhoramento vegetal e em programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos (FALEIRO, 2007). Assim, a caracterização molecular é uma ferramenta útil para a avaliação da diversidade genética de coleções de germoplasma, pois os marcadores moleculares podem ser obtidos em grande número, apresentam comportamento mendeliano, são distribuídos por todo o genoma, são neutros e não sofrem implicações ambientais. Além dessas vantagens, contribui na tomada de decisão nos processos de coleta, manejo e intercâmbio de acessos, em bancos de germoplasma, bem como auxilia na escolha de genitores a serem utilizados em programas de melhoramento (FALEIRO, 2007). Através do estudo genético e fisiológico é possível melhorar a qualidade das sementes de *Capsicum* sp.

Assim, este trabalho buscou avaliar a qualidade genética e fisiológica das sementes de *Capsicum* sp. por meio de estudos relacionados com a maturação dos frutos e a taxa de cruzamento natural.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Origem das pimentas**

As pimentas e os pimentões pertencem ao gênero *Capsicum* e à família de maior importância entre as hortaliças cultivadas, *Solanaceae*, assim como o tomate, a berinjela, a batata e o jiló. São originárias do continente americano e sua disseminação pelos demais continentes iniciou-se a época das grandes navegações, no final do século XV (MAISTRE, 1964). Há registros do seu consumo de aproximadamente 9000 a. C. em explorações arqueológicas no México. Os índios nativos das Américas utilizavam a pimenta de forma contínua, tanto na alimentação como armas de guerra, antes mesmo do descobrimento do Brasil. Quando atacavam, queimavam montes de pés dessa planta perto das fortificações dos inimigos, criando uma fumaça afugentadora (REIFSCHNEIDER, 2000).

A contribuição histórica na disseminação destas plantas pelo mundo, eficientemente feita pelos navegadores portugueses e pelos povos que eram transportados juntos às grandes embarcações, possibilitou que essas espécies de pimenta picantes e doces, viajassem pelo mundo. As pimentas foram, então, introduzidas na África, Europa e posteriormente, na Ásia (REIFSCHNEIDER, 2000). São cultivadas, atualmente, em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo como condimento ou hortaliça.

### **2.2 Características botânicas**

A taxonomia dentro do gênero *Capsicum* é complexa, devido à grande variabilidade de formas existentes nas espécies cultivadas e à diversidade de critérios utilizados na classificação. Na década de 1950, diversas espécies de *Capsicum* foram classificadas dentro de outros gêneros (BOSLAND e VOTAVA, 1999). Atualmente, pelo menos 30 espécies de *Capsicum* são reconhecidas, sendo cinco domesticadas (largamente cultivadas) e 25

semidomesticadas (pouco cultivadas) e silvestres, não cultivadas comercialmente (PICKERSGILL, 1997). Das espécies cultivadas: *C. annuum* (pimentão, pimentas e pimentas ornamentais), *C. baccatum* (pimentas dos grupos varietais dedo-de-moça, cambuci e chapéu-de-frade), *C. chinense* (pimentas-de-cheiro ou pimenta-de-bode, murici, murupi e pimenta-de-bico), *C. frutescens* (pimentas malagueta e tabasco) e *C. pubescens*, apenas a última não é cultivada no Brasil (CASALI e COUTO, 1984; NUEZ *et al.*, 1996; PICKERSGILL, 1997; BOSLAND e VOTAVA, 2000). As principais características utilizadas na distinção das espécies são relativas à morfologia floral. No que se refere a esse atributo, considera-se o número de flores por nó, posição da flor e do pedicelo, coloração da corola e da antera, presença ou ausência de manchas no lobo das pétalas e margem do cálice, formato dos frutos e características morfológicas das sementes (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

As espécies domesticadas de *Capsicum* geralmente são autógamas, ou seja, são autopolinizadas (o pólen de uma flor fecunda o estigma da mesma flor), facilitando a reprodução. No processo de autogamia não ocorre recombinação genética e, por isso, todos os frutos provenientes de uma mesma planta serão iguais e as sementes produzirão plantas semelhantes. Entretanto, pode ocorrer algum fluxo gênico devido à presença de insetos polinizadores entre variedades e até mesmo entre diferentes espécies do gênero, pois pode ocorrer alguma taxa de alogamia (polinização cruzada) favorecida por diferentes taxas de compatibilidade (REIFSCHNEIDER *et al.*, 2008). Dependendo da localização e espaçamento das plantas, população de insetos e outras condições ambientais, a taxa de alogamia pode variar entre 2 a 90% (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008; PICKERSGILL, 1997). As espécies *C. chinense* e *C. frutescens* podem ser cruzadas facilmente entre si, já o cruzamento com *C. annuum* só é facilitado quando esta for utilizada como espécie doadora de pólen (GREENLEAF, 1986).

Essas espécies botânicas constituem um grupo com características próprias, que produzem frutos geralmente com sabor picante, embora também existam pimentas doces. São plantas arbustivas, com caule resistente, perene, atingindo 1,20 m de altura, com amplas ramificações laterais. Os frutos em sua maioria variam de 1 a 12 cm de comprimento e, o formato varia segundo a espécie, há frutos alongados, arredondados, triangulares e quadrados, pouco ou muito enrugados, de cores variáveis, amarelo, laranja, verde, vermelho, roxo e marrom (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008). A pimenteira se adapta muito bem aos climas quentes, sendo sensível a baixas temperaturas e não tolera geada (NASCIMENTO *et al.*,

2006). A altura e a forma da planta variam de acordo com a espécie e com as condições de cultivo. Quanto à arquitetura, as plantas predominantes no gênero *Capsicum* podem ser classificadas como arbustos perenes, embora em algumas partes do mundo se comportem como anuais (BOSLAND, 1996).

O sistema de ramificação segue um padrão típico de dicotomia e inicia-se quando a plântula atinge de 15 a 20 cm de altura. As hastes podem variar de glabras até muito pilosas, podendo apresentar antocianina ao longo de seu comprimento e/ou nos nós. Um ramo jovem sempre é finalizado em uma ou muitas flores. Quando isso ocorre, dois novos ramos vegetativos emergem das axilas das folhas e continuarão o crescimento até formar novas flores. As flores típicas são hermafroditas, ou seja, a mesma flor produz gametas masculinos e femininos, possuem cálice com cinco sépalas, e em alguns casos, podem ocorrer de seis a oito, a corola possui cinco pétalas podendo, em alguns casos, variar de seis a oito. Para a identificação das espécies, os taxonomistas examinam principalmente as flores que variam com relação a características morfológicas como posição da flor e do pedicelo, número de flores por nó, coloração da corola e da antera, presença ou ausências de manchas nos lobos das pétalas e margem do cálice (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

As raízes são do tipo pivotante, com um número elevado de ramificações laterais, podendo atingir até 70 a 120 cm de profundidade. As folhas apresentam tamanho, formato, coloração e pilosidade variados. Tipicamente, as folhas apresentam coloração verde, embora possam existir folhas violetas e variegadas. Quanto ao formato do limbo foliar, pode variar de ovalado, lanceolado a deltóide (BOSLAND e VOTAVA, 1999).

Em termos botânicos, o fruto é definido como uma baga, glabro, decíduo ou persistente, com pedicelos frutíferos eretos ou pendentes. Essa variabilidade se deve a múltiplas formas, tamanhos, cores e teores de pungência. Por observação de determinadas características morfológicas e diferentes usos, é possível diferenciar as pimentas dos pimentões. As pimentas são geralmente menores, de formato variado e característica predominantemente pungente. São usadas principalmente como condimento. Já os pimentões são frutos bem maiores que as pimentas variando de 10 a 20 cm de comprimento por 6 a 12 cm de largura, de formato retangular, quadrado a retangular, e não apresentam capsaicina (pungência) em sua composição (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

O pimentão e várias pimentas pertencentes à espécie *C. annuum* apresentam flores solitárias e corola branca. A diferença entre pimenta e pimentão é de natureza genética e devida, provavelmente, a uma mutação no caráter responsável pela pungência das pimentas, sendo a capsaicina um dos principais componentes responsáveis por esse caráter, dando origem a plantas não - pungentes. A pungência é um caráter dominante, mas bastante afetado pelo ambiente. A partir da descoberta do tipo doce, a pimenta foi sendo selecionada pelo homem, visando à obtenção de frutos maiores e a manutenção do caráter não - pungente, originando o pimentão (PICKERSGILL, 1971; PICKERSGILL, 1997).

## **2.3 Principais espécies domesticadas de *Capsicum* encontrados no Brasil**

### **2.3.1 *Capsicum annuum* L. var. *annuum***

A espécie compreende os tipos mais comuns do gênero *Capsicum*, como os pimentões e algumas pimentas como as doces, destinadas para páprica, as pimentas pungentes jalapeño, cayenne, cereja, serrano, entre outras, além das ornamentais (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008). Existe uma grande variabilidade fenotípica nos genótipos resultante, provavelmente, do processo de domesticação e posterior seleção e melhoramento genético, incluindo cruzamentos interespecíficos (RIBEIRO *et al.*, 2008). Acessos desta espécie são encontrados tanto na forma selvagem quanto na cultivada. Em seu ambiente selvagem, a planta é semi-perene e com hábito de crescimento ereto. Quando cultivada, é conduzida de forma anual, apresentando-se como planta herbácea (RIBEIRO *et al.*, 2008).

As flores dos diferentes tipos de *Capsicum annuum* var. *annuum* são hermafroditas, uniformes, apresentando geralmente uma flor por nó, raramente mais e ocasionalmente fasciculadas. Apresentam pedicelos eretos, pendentes ou inclinados, na fase de antese. A corola é branca, raramente violeta, sem mancha na base dos lobos, e as anteras geralmente são azuladas (CASALI e COUTO, 1984). Nas flores, o cálice é bastante pronunciado, devido ao prolongamento das nervuras, sendo que no fruto este verticilo se apresenta pouco dentado e sem constrição anelar com o pedicelo. Os frutos podem ser extremamente diferentes quanto

ao formato, tamanho, coloração, pungência e posição na planta (REIFSCHNEIDER, 2000). As sementes são da cor amarelo-palha (CASALI e COUTO, 1984).

### **2.3.2 *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* (Willd.) Eshbaugh**

Os tipos mais comuns e cultivados da espécie *C. baccatum* no Brasil são as pimentas dedo-de-moça, também conhecidas como chifre-de-veado, calabresa ou pimenta-vermelha; pimenta-cambuci ou chapéu de frade (RIBEIRO *et al.*, 2008). No Brasil são encontradas com maior frequência na Região Sul. As pimentas mais cultivadas desta espécie são as do tipo dedo-de-moça ou chifre-de-vedo e a cambuci ou chapéu-de-frade. Neste grupo, a pungência dos frutos é variável de pungentes a não pungentes, tais como a pimenta Cambuci, predominando a pungência suave à mediana. Esta espécie apresenta duas variedades botânicas: *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *baccatum* (RIBEIRO *et al.*, 2008).

As plantas, quando mantidas por alguns anos, chegam a formar verdadeiros arbustos, chegando a 3,0 m de altura, folhas membranáceas longipeciouladas e caule apresentando dicotomia evidente com pedicelo ereto durante a antese (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008). As flores são em número de uma a duas por nó. A corola é branca e sempre com manchas amareladas ou esverdeadas na base de cada lobo das pétalas, o cálice, quando o fruto está maduro, possui apêndices pronunciados e sem constrição anelar. As anteras geralmente são amarelas (REIFSCHNEIDER, 2000). Os frutos são pequenos, de coloração vermelha quando maduros, e dependendo da variedade podem ser alongados, arredondados ou ovalados (BIANCHETTI, 1996; CARVALHO *et al.*, 2009a). As sementes são claras, amarelas, beges ou brancas (CASALI e COUTO, 1984).

### **2.3.3 *Capsicum chinense* Jacquin**

A Bacia Amazônica é o principal centro de diversidade dessa espécie, embora possa ser encontrada desde a América Central até o Sul do Brasil, por isso *Capsicum chinense* é

considerada a mais brasileira das espécies domesticadas (REIFSCHNEIDER *et al.*, 2000). O nome da espécie, *Capsicum chinense*, classificado por Nicolaus Joseph Von Jacquin surgiu de um equívoco, quando este pesquisador supunha que este genótipo fosse originário da China (BOSLAND e VOTAVA, 1999).

No Brasil, a espécie é representada pelas pimentas-de-cheiro, pimenta-bode, cumarido-Pará, murupi, habanero e pimenta-biquinho. Devido ao estreito relacionamento genético, essa espécie pode ser facilmente confundida com *C. frutescens*. A planta apresenta folhas glabras de formato ovado a ovado lanceoladas e os ramos também são desprovidos de pelos (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008). As flores estão dispostas de duas a cinco por nó, raramente solitárias, apresentam corola, predominantemente, branca-esverdeada, sem manchas amareladas na base dos lobos. Geralmente, as anteras são azuis, roxas, violetas ou amarelas, o cálice tem cinco apêndices ou às vezes desprovido destes, o pedicelo é pendente, raramente ereto, e os frutos com 1,0 a 12 cm de comprimento apresentando formas e cores variadas (LUZ, 2007). A principal distinção morfológica desta espécie é uma constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

#### **2.3.4 *Capsicum frutescens* L.**

Os tipos mais comuns desta espécie são as pimentas malaguetas, assim chamadas no Brasil, e nos Estados Unidos são conhecidas como tabascos. Estas pimentas são extremamente picantes (com alta concentração de capsaicinóides), e amplamente disseminadas no Brasil (CASALI e COUTO, 1984). Esta espécie apresenta variabilidade morfológica bem menor quando comparadas as outras espécies.

As plantas são arbustivas, vigorosas, com altura de 0,9 a 1,2 m e bastante ramificadas, folhas glabras de formato oval a alongadas, medindo de 7-13 x 5-7 cm e pedicelo ereto, durante a antese. Suas flores estão agrupadas de uma a três por nó, ocasionalmente fasciculadas. Apresentam corola de cor branca esverdeada e sem manchas, pedicelos tipicamente eretos e anteras geralmente azuis, roxas ou violetas (REIFSCHNEIDER, 2000). Os frutos são pequenos de formato alongado e quando maduros, são de coloração vermelha, bem picante, com 2,5 a 5,0 cm de comprimento e 0,3 a 0,5 cm de diâmetro (CARVALHO *et*

*al.*, 2006). Trata-se de um grupo de pimentas mais conhecido, destinado tanto ao consumo *in natura* como em conservas e molhos.

## 2.4 Importância nutricional

A importância das pimentas está atribuída ao sabor, ao aroma e à composição química, a qual é constituída por carboidratos, proteínas, lipídeos, fibras, sais minerais e vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C e E. A concentração de vitamina C (ácido ascórbico) pode chegar até 250 mg por 100 gramas de fruto fresco (BOSLAND e VOTAVA, 2000). Este valor é comparável ao da goiaba (200 mg por 100 g de fruto), porém, está abaixo da concentração da acerola, que pode atingir até 1800 mg por 100 g de fruto fresco (COSTA *et al.*, 2001), mas superando o da laranja, com 60 mg por 100 g de polpa (CARVALHO, 1984). O conteúdo de ácido ascórbico em frutos de *C. annuum* varia de 65,5 mg a 136,1 mg por 100 g de fruto fresco (YAHIA *et al.*, 2001). Os teores de vitamina C em frutos de coloração branca, roxa ou preta são menores quando comparados com frutos maduros de coloração vermelha, amarela ou laranja (SIMONNE *et al.*, 1997).

Com relação à vitamina A, os frutos de pimenta são ricos, visto que três a quatro gramas de fruto vermelho atendem às necessidades diárias dessa vitamina no organismo adulto. Os valores de vitamina A encontrados são aproximados aos encontrados na cenoura (SIMÕES *et al.*, 2004). Essa vitamina está presente nos frutos de pimenta na forma de pró-vitamina A, que são os  $\alpha$  e  $\beta$ -carotenos e a criptoxantina. Dessas três substâncias, a mais importante é o  $\beta$ -caroteno, pois, além de encontrar-se em maior proporção no fruto, de uma molécula de  $\beta$ -caroteno formam-se duas de vitamina A pelo metabolismo do fígado humano, diferentemente do  $\alpha$ -caroteno e da criptoxantina que formam uma molécula apenas (BOSLAND, 1993). Pimentas malaguetas contêm até 11.000 UI de vitamina A, valor equivalente ao da cenoura até 13.000 UI de vitamina A, considerada fonte de altos teores de vitamina A (CARVALHO, 1984). Além dos carotenóides, os capsaicinóides, as vitaminas e os ácidos voláteis determinam a cor e o sabor aos frutos de pimenta (NUEZ *et al.*, 1996).

Os carotenóides são pigmentos naturais encontrados em plantas de *Capsicum* associados à cor vermelha dos frutos maduros. Sua variável composição e concentração é

responsável por frutos diversamente coloridos (WILDMAN, 2000). Estes pigmentos são basicamente formados por compostos dos grupos dos carotenóides (capsantina, capsorubina, caroteno, zeaxantina e criptoxantina) e dos grupos dos flavonóides (OLIVEIRA, 1978). Tais pigmentos têm sido amplamente utilizados como corantes em várias linhas de produtos processados (CASALI e STRINGHETA, 1984). Os carotenóides  $\beta$ -caroteno, criptoxantina e zeaxantina são precursores da rota biossintética da maturação dos frutos, enquanto capsantina e capsorubina são carotenóides terminais, isto é, são responsáveis pela expressão da cor no fruto. Dentre os pigmentos vermelhos dos frutos, pode-se destacar a capsantina, que representa cerca de 35% do total desses pigmentos, seguida de  $\beta$ -caroteno e violaxantina, com cerca de 10% cada, criptoxantina e capsorubina, com 6% cada e criptocapsina, com cerca de 4%. Os demais representam menos de 2% do total no fruto (NUEZ *et al.*, 1996). Estes compostos apresentam importantes funções fisiológicas no tecido vegetal atuando na chamada “função de antena”, absorvendo o excesso de energia luminosa e dissipando-a sob a forma de calor (BILGER *et al.*, 1995). Alguns carotenóides apresentam também a ação de pró-vitamina A, que é convertida durante a digestão para o retinol, forma ativa da vitamina A (FRASER e BRAMLEY, 2004).

Além destes compostos, também são atribuídas às pimentas, algumas propriedades medicinais por conter em sua composição um alcalóide, a capsaicina, que atua em várias áreas do corpo como antioxidante, anti-inflamatório, cicatrizante, estimulante da circulação sanguínea e da digestão, controla os níveis de glicose no sangue; provoca bem-estar, devido à estimulação à liberação de endorfinas, fabricadas no cérebro e responsáveis por sensações agradáveis, gerando bom humor (CARVALHO, 2005). Alivia dores de cabeça, musculares, reumáticas, queimaduras, articulações, gota, lombalgia e torcicolo. Auxilia na dissolução de coágulos sanguíneos, no controle do colesterol, no aumento da capacidade pulmonar, na gastrite aguda e ajuda no tratamento da rinite alérgica. Esses benefícios foram descobertos pelos povos primitivos há milhares de anos e só agora estão sendo comprovados pela ciência (CARVALHO, 2005).

Os capsaicinóides são responsáveis também, pelo sabor pungente atribuído às pimentas. Dentre os capsaicinóides, o componente mais importante é a capsaicina (70%), seguida da diidrocapsaicina (20%), entre outros (LUZ, 2007). Tais alcalóides são produzidos na placenta e liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico, conferindo efeito picante, característica exclusiva do gênero *Capsicum*. O nível de pungência das pimentas é medida por

uma escala de análise sensorial conhecida como Unidades de Calor Scoville (Scoville Heat Units – SHU) com aparelhos específicos como o de Cromatografia Líquida de Alta Precisão (HPLC). Cada parte por milhão de capsaicina presente nos frutos representa 15 unidades Scoville de calor. Com a escala de calor, o fruto de pimenta pode ser classificado em não pungente (até 700 SHU), ligeiramente pungente (700 - 3.000 SHU), moderadamente pungente (3.000 - 25.000 SHU), pungente (25.000 - 70.000 unidades Scoville de calor) e muito pungente (acima de 80.000 SHU) (BOSLAND, 1993).

Os primeiros estudos realizados no início do século XX sobre o número de genes que controlam a pungência afirmavam ser uma característica monogênica (GREENLEAF, 1986). A teoria poligênica foi proposta por Ohta em 1960, quando os teores de capsaicina nos frutos passaram a ser determinados pelo uso das técnicas de cromatografia e espectrofotometria (GREENLEAF, 1986).

Em estudos com híbridos de *C. annuum* e *C. chinense* foram verificados a herança da capsaicina e foi concluído que a síntese de capsaicinóides é controlada por diferentes genes e apresenta herança quantitativa, o que explica a variação nos níveis de capsaicinóides nos frutos de pimenta (ZEWDIE e BOSLAND, 2001). Essa substância presente nas pimentas picantes, a capsaicina, é utilizada pelas indústrias de cosméticos para fabricação de xampus antiqueda e anticaspas; na indústria farmacêutica para formulação de pomadas para artrite e artrose e, no famoso emplastro ‘Sabiá’, e, também, utilizada como arma, na forma de spray de pimenta (HENZ e COSTA, 2005).

#### **2.4.1 Potencial antioxidante das pimentas**

O efeito nutracêutico dos compostos carotenóides em seres humanos e animais se deve ao elevado poder antioxidante destes compostos, atuando na eliminação de radicais livres e protegendo as células de sua ação nociva (CASALI e STRINGHETA, 1984).

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis à oxidação (HALLIWELL, 1999). Há uma importante

correlação entre a formação dos radicais livres com a maior parte das doenças crônico-degenerativas, doenças auto-imunes, infecciosas e inflamatórias. Os radicais livres são instáveis e são interceptados pela ação de agentes antioxidantes (OLSZEWER, 2000).

Estudos para verificar a atividade antioxidante dos frutos de pimenta, conforme o seu estágio de maturidade, relatam que há uma diferença na atividade antioxidante entre os frutos verdes e os maduros, sendo que os frutos maduros apresentam maior atividade antioxidante (PERUCKA e OLESZEK, 2000).

Os flavonóides são pigmentos naturais presentes em vegetais e que protegem o organismo do dano produzido por agentes oxidantes, como os raios ultravioleta, substâncias químicas presentes nos alimentos, poluição ambiental, etc. Como o organismo humano não pode produzir estas substâncias químicas protetoras, as mesmas devem ser obtidas mediante alimentação ou em forma de suplemento (TOPUZ e OZDEMIR, 2004). A quercitina e a luteolina são flavonóides encontrados em maior conteúdo nas pimentas e apresentadas de forma conjugada. Luteolina tem maior atividade antioxidante seguida pela capsaicina e pela quercitina (LEE *et al.*, 2005).

#### **2.4.2 Propriedades anticâncer e antimutagênica das pimentas**

Uma vez que a mutação é um dos mecanismos pelo qual o câncer é causado, uma substância antimutagênica provavelmente poderá prevenir a carcinogênese. Pesquisas extensivas nos últimos anos revelaram que o consumo regular de frutas e hortaliças pode reduzir o risco de adquirir específicos tipos de câncer (GOLSBY, 2002). Em um estudo conduzido no México analisando o efeito de extrato de pimenta na mutagenicidade de amostras de ar da cidade, revelou que o extrato foi capaz de modular a atividade mutagênica das amostras, e que a clorofila e o betacaroteno encontrados no extrato mostraram efeito antimutagênico contra compostos nitro-aromáticos (KOUL e KAPIL, 1993).

A capsaicina possui propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas através da inibição de enzimas que poderiam iniciar a mutação de células ou através da inibição de metabólitos carcinogênicos, como, por exemplo, o NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-

1-butanone] do tabaco (MODLY, 1986). A ação protetora desta molécula também parece ser eficaz contra efeitos maléficos de carcinógenos presentes no tabaco (nitrosamina) e no cigarro (benzopireno) (SUHR *et al.*, 2002). Um estudo de caso-controle realizado na Itália mostrou que o consumo de capsaicina pode diminuir o risco de desenvolver câncer gástrico. O alto risco de câncer gástrico encontrou-se relacionado especialmente ao uso do sal, enquanto que o baixo risco estava relacionado ao consumo de temperos, azeite de oliva e alho (BAYNES e DOMINICZAK, 2000). Alguns fitoquímicos derivados de frutas e vegetais, como a capsaicina (das pimentas), o licopeno (do tomate), a alicina (do alho), a genisteína (da soja), o resveratrol (do vinho) e o eugenol (do cravo) são agentes quimiopreventivos. Estes agentes apresentam grande valor terapêutico não somente na prevenção, como também têm sido usados como adjuvantes nas terapias, pois dados revelam que podem reverter a quimioresistência e radioresistência em pacientes em tratamento de câncer (DORAI e AGGARWAL, 2004).

## **2.5 Importância para o Brasil**

As pimentas e os pimentões são cultivados, praticamente, em todo o mundo, principalmente na China, Tailândia, Coreia do Sul, Índia, Japão, México, e nos Estados Unidos (RUFINO e PENTEADO, 2006). No Brasil, são cultivados cerca de 13.000 hectares com pimentão e pimentas doces e picantes, com uma produção aproximada de 280.000 toneladas (EMBRAPA, 2002). O cultivo de pimentões doces para consumo *in natura* ocorre praticamente em todas as regiões. Recursos na ordem de US\$ 1,5 milhão/ano são movimentados na comercialização de sementes de cultivares melhoradas e híbridos para o segmento de pimentões para mesa (EMBRAPA, 2002). Parte da produção brasileira de pimentas é exportada, em diferentes formas, como páprica, pasta, desidratada e conservas ornamentais. Em 2005, o volume de exportações de *Capsicum* atingiu 9.222 toneladas, no valor aproximado de US\$ 23.500.000, se posicionando abaixo do melão na pauta de hortaliças exportadas e dentro do grupo das dez hortaliças mais importantes no país (NAPOLEÃO, 2006).

Um aspecto importante é a carência de dados estatísticos amplos, reais e consolidados sobre produção e área cultivada com pimenta-hortícola no Brasil. Essa situação tem como uma das causas a forma de cultivo e a comercialização dessa hortaliça. A pimenta é cultivada, tradicionalmente, em muitos locais e em áreas pequenas, cujo comércio também é local e onde não são feitas coletas de dados de produção. As informações disponíveis, atualmente, são aquelas geradas pelo produto que passa pelas centrais de abastecimento e não representam a realidade do agronegócio da pimenta no Brasil. São dados subestimados tanto pelo volume produzido quanto pela diversidade de produto. Há carência de informações quantitativas sobre o produto processado nos seus diversos segmentos (molhos, conservas, geleias etc.) e modos de produção (industrial e artesanal). Finalmente, também não há dados sobre o mercado de pimenta ornamental (NASCIMENTO, 2004).

O cultivo de pimentas está se modificando com a influência de novos nichos de mercado. Além de assumir grande importância para o País, está aquecendo o mercado mundial com o aumento das exportações (NASCIMENTO *et al.*, 2006). É um dos melhores exemplos de integração pequeno agricultor-agroindústria, principalmente em se tratando de uma cultura geradora de emprego e renda (REIFSCHNEIDER, 2000). Por ser uma cultura que demanda muita mão-de-obra, principalmente por ocasião da colheita (uma pessoa colhe de 8 a 10 kg de pimenta por dia), torna-se uma lavoura característica da agricultura familiar. A cultura apresenta também elevada taxa de retorno do investimento, com uma renda bruta que oscila entre R\$ 4 e 25 mil/ha/ano (VILELA *et al.*, 2008; GONÇALVES, 2004). No Brasil, cultivam-se pimentas do gênero *Capsicum* em praticamente todos os estados da federação, sendo os principais produtores Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (NASCIMENTO *et al.*, 2006). A área anual cultivada com pimentas é de cerca de cinco mil hectares, com produção aproximada de setenta e cinco mil toneladas (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2008). A produtividade média depende do tipo de pimenta cultivada, variando de 10 t/ha a 30 t/ha (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2008).

A crescente demanda do mercado tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas (doces e picantes) um dos segmentos importantes do país (RUFINO e PENTEADO, 2006). Além dos diversos usos, o mercado de pimentas no Brasil está sofrendo grandes modificações pela exploração de novas variedades e pelo desenvolvimento de produtos com grande valor agregado. Exemplos são o caso da pimenta processada, convertida e usada em molhos, sopas em pó de preparo

instantâneo, geleias, bombons, embutidos de carnes, principalmente linguiças, salames e salsichas, corantes naturais, rações de aves, massas, biscoitos, patês, “ketchup”, maionese, dentre outras (NASCIMENTO, 2004).

Outras características de interesse, que estimulam o consumo e a produção das espécies do gênero *Capsicum* é a ampla utilização na culinária, devido as suas propriedades de acentuar sabor, aroma e cor a diversos pratos. Considerando o consumo dos frutos verdes e *in natura*, o pimentão é a principal fonte de vitamina C dentre as hortaliças, contendo até 180 mg/100g, ultrapassando o teor das frutas cítricas, fontes tradicionais desta vitamina (LÚCIO *et al.*, 2003). Em algumas regiões existem pequenas indústrias que fazem o processamento utilizando o álcool e a cachaça (SOUZA e SILVA, 1999). O uso dessa espécie como planta ornamental e como conservas ornamentais é dos mais rentáveis e atraentes.

## **2.6 Mercado de sementes de pimenta no Brasil**

No Brasil, apesar de ser o centro de origem e diversidade do gênero *Capsicum* e consumidor de pimentas nas mais variadas culinárias regionais e também como exportador, o mercado de sementes de pimentas ainda é pequeno, porém, com grande tendência de crescimento. Além da produção interna de sementes de pimentas, o Brasil recorre à importação para atender à demanda interna. As empresas que comercializam sementes de pimenta ainda são poucas e, aquelas que o fazem, restringem-se a alguns tipos específicos (NASCIMENTO, 2004). A maioria das cultivares de pimentas plantadas no Brasil é considerada variedade botânica ou grupo varietal, com características de frutos bem definidos. As espécies mais cultivadas são *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum* (RIBEIRO, 2004).

Apesar de sua reconhecida importância econômica e social, do crescente interesse no cultivo de pimentas e de existirem diversas cultivares registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a cultura da pimenta é pouco estudada no Brasil, em todas as suas fases do sistema de produção, e são poucas as cultivares disponíveis no mercado brasileiro de sementes (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Assim, um dos problemas enfrentados pelos produtores de pimenta é a modesta

quantidade de cultivares disponibilizadas no mercado pelas companhias de sementes. Essa restrição da oferta de sementes de qualidade e o desinteresse por parte das empresas de sementes pelo desenvolvimento de novas cultivares estão relacionados aos aspectos peculiares das técnicas de produção, como baixo rendimento de sementes, dificuldade de extração das sementes, aos problemas relacionados com a qualidade fisiológica, entre outros (NASCIMENTO, 1991). Diante desse fato, o cultivo de pimentas ainda é feito por pequenos produtores, que utilizam suas próprias sementes ou extraem sementes de frutos comprados em feiras e mercados, sementes essas de frutos não certificados quanto à sanidade e pureza, resultando em material de plantio de baixa qualidade; essas sementes são de qualidade variável, podendo resultar em perdas totais de produção (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Sementes de qualidade comprovada garantem o desenvolvimento de plantas vigorosas, uniformes, sadias e conseqüentemente, proporciona boa produtividade da lavoura, trazendo com isso, vantagens econômicas, sociais e ambientais. Os processos fisiológicos relacionados com o desenvolvimento e a germinação de sementes determinam a qualidade das mesmas (NASCIMENTO, 1991).

## **2.7 Processo de desenvolvimento das sementes**

### **2.7.1 Grão de pólen**

O grão de pólen maduro é constituído por uma parede celular dupla (uma membrana externa – exina, e outra interna – intina), um núcleo vegetativo e pelo menos um núcleo generativo ou reprodutivo, todos haplóides. A superfície da exina é dotada de espessamentos, rugas, cristais, pontas ou espinhos, que permitem a fixação e retenção do grão de pólen na superfície do estigma após a polinização. A superfície dessa membrana externa não é contínua, sendo evidente a presença de poros que, dentre outras funções, favorecem a expansão do tubo polínico; é espessa e contém esporopolenina, substância muito resistente à decomposição. A intina é mais delgada e contém pectina e celulose. Os grãos de pólen contêm proteínas, lipídios, aminoácidos livres, vitaminas e pequenas quantidades de auxinas e

giberelinas; estes dois fitormônios estimulam o desenvolvimento das paredes do ovário e a formação do fruto (MARCOS FILHO, 2005).

Em função de sua grande diversidade morfológica, os grãos de pólen têm grande importância para fins taxonômicos e investigações paleontológicas, pois são encontrados em perfeitas condições de conservação nas diversas camadas geológicas, devido à natureza das substâncias da exina (MARCOS FILHO, 2005); entretanto, altas ou baixas temperaturas podem afetar a viabilidade do pólen (GEORGE, 1983). Os grãos de pólen apresentam diversidade de forma, de tamanho e de características externas da exina, típicas de cada espécie, as quais se relacionam com a sua dispersão abiótica (vento, água) ou biótica (insetos, pássaros, mamíferos) (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

### **2.7.2 Polinização**

A polinização é a transferência do grão de pólen do estame ao carpelo. Logo após o amadurecimento das anteras, há a deiscência destas e em seguida a liberação dos grãos de pólen, que são disseminados por vários agentes, como insetos, pássaros, mamíferos, o próprio vento e a água, o que permite que estes atinjam o estigma e se processe a polinização. O estigma apresenta-se geralmente com papilas ou pêlos e com variações, em função da espécie. O estigma exsuda uma substância altamente específica (líquido estigmático) que evita a sua dessecação e favorece o recebimento dos grãos de pólen, garantindo ótimas condições para a sua germinação. Esta substância é rica em glicoproteína, mucilagem e nutrientes, sendo abundante no estigma tipo úmido e escasso no tipo seco (FOSKEY, 1994). A polinização é fundamental para a produção de sementes porque precede a fertilização dos ovários (GEORGE, 1983).

Apesar das pimentas se reproduzirem preferencialmente por autofecundação, a taxa de polinização cruzada natural pode variar conforme as condições de cultivo (TANKSLEY, 1984; GEORGE, 1985). As flores de algumas cultivares de pimentas picantes possuem um estilete mais comprido, logo a possibilidade de autopolinização é menor favorecendo a polinização cruzada. Estudos realizados em outros países têm mostrado que a polinização cruzada em pimentas pode ocorrer em uma faixa de 2 a 90% (TANKSLEY, 1984;

PICKERSGILL, 1997). Em um estudo com *Capsicum frutescens*, foi verificada taxa de cruzamento natural variando de 9 a 38%, dependendo da variedade (ODLAND e PORTER, 1941).

Na polinização, um desconhecido fator de estímulo tem sido descrito por estar presente no pólen, devido ao estímulo da auxina na formação do ovário (KESSEL, 1976). A auxina, também conhecida como ácido indol-3-acético, em alguns frutos, induz o pegamento e o crescimento de partes da flor (DAVIES, 1990). Este fito-hormônio tem como função primordial garantir a manutenção e o crescimento do ovário da flor. No grão de pólen, a auxina apresenta importante papel para o desenvolvimento normal do fruto. Em muitas plantas, a semente continua a produzir reguladores de crescimento, como a auxina, até o momento de amadurecimento do fruto (USP, 2003). Alguns autores também sugerem que a auxina, por estar em alta concentração no pólen, funciona com um estímulo na polinização (REID *et al.*, 1984).

### **2.7.3 Fertilização e desenvolvimento da semente**

A formação da semente começa com o processo de fecundação pela união dos gametas. As anteras rompem-se ao alcançarem a maturidade, liberando os grãos de pólen em direção ao estigma. Quando os grãos de pólen alcançam o estigma da flor, se aderem à superfície graças às características da exina e das peculiaridades da área do estigma, as quais facilitam a fixação do pólen. Em seguida, os grãos de pólen absorvem o líquido estigmático e germinam, formando tubos polínicos que se desenvolvem no interior do estilete até alcançar o ovário. A formação do tubo polínico e seu desenvolvimento no interior do estigma não ocorrem de maneira indiscriminada, somente é notório em plantas da mesma espécie ou de espécies estreitamente relacionadas (CHASAN e WALBOT, 1993). Este tubo é formado pelo crescimento da intina, que atravessa a exina através dos poros. A intina se projeta, formando um ou mais tubos polínicos, mas apenas um atinge o saco embrionário, transportando os gametas (DUMAS e MOGENSEN, 1993).

A temperatura ideal para a germinação do tubo polínico na maioria das espécies situa-se entre 21 e 27°C, sendo a mínima geralmente em torno de 5°C. O período entre a

formação do tubo polínico e a fecundação é variável, podendo durar alguns minutos ou horas (BOTS e MARIANI, 2005), e depende da temperatura, disponibilidade de água, compatibilidade genética e do tipo de canal do estilete (DUMAS e MOGENSEN, 1993).

Como os tubos polínicos crescem entre as células do estilete, as enzimas por ele segregadas degradam as lamelas médias, e as paredes celulares aparecem convertidas em mucilagem. O tubo polínico parece nutrir-se dos componentes (mucopolissacarídeos, lipoproteínas, glicoproteínas) encontrados no tecido transmissor do estilete. O crescimento do tubo polínico é controlado por substâncias de crescimento naturais, nas quais se incluem tanto promotores, como inibidores. Molisch foi o primeiro que evidenciou experimentalmente os promotores de crescimento, sugerindo que tais substâncias dirigem o tubo polínico por quimiotropismo (RODRIGUES *et al.*, 1977). Isso supõe que os promotores de crescimento do tubo polínico participam da direção quimiotrópica do tubo até o óvulo, e que os inibidores do crescimento atuam na incompatibilidade de reação entre o grão de pólen e o estigma, ou estilete (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

A célula vegetativa pode ou não ser conduzida na extremidade do tubo polínico, à frente das reprodutivas. Existem casos em que degeneram antes da germinação do grão de pólen ou nos primeiros estádios de crescimento do tubo polínico. A disponibilidade de cálcio no estigma, o turgor celular e a concentração de boro são considerados fatores controladores da germinação e desenvolvimento do tubo polínico. É possível também que um gradiente de concentração de cálcio conduza o tubo polínico em direção ao saco embrionário, sendo esse gradiente talvez criado mediante atuação das sinérgidas. De qualquer forma, como o tubo polínico se desenvolve no interior do estilete, este libera enzimas responsáveis pela degradação de tecidos, constituindo um canal que permite a sua passagem. O tubo polínico cresce em direção ao ovário e, ao atingí-lo, penetra no óvulo (MARCOS FILHO, 2005).

A fecundação do óvulo se inicia pela ruptura do tubo polínico, assim que alcança o saco embrionário através da micrópila, onde depositam as duas células espermáticas do grão de pólen e degenera logo após. Em seguida, ocorre a união de um dos gametas masculinos ao núcleo da oosfera (singamia), para formar o ovo fertilizado ou zigoto ( $2n$ ), a partir do qual surge o embrião da semente; o outro núcleo reprodutivo se une aos dois núcleos polares do saco embrionário (fusão tripla), para formar o núcleo do endosperma ( $3n$ ), caracterizando a dupla fertilização típica das angiospermas. O núcleo endospermático, após inúmeras divisões celulares e outras transformações, dá origem ao endosperma; o zigoto dá origem ao embrião,

enquanto os integumentos do óvulo são os precursores dos tegumentos da semente (MARCOS FILHO, 2005).

A fertilização da maioria dos óvulos e conseqüente formação de um maior número de sementes e frutos de qualidade superior, é a conseqüência direta da polinização. Quanto mais eficiente for o processo de polinização, ou seja, quanto maior for o número de grãos de pólen viáveis e compatíveis no estigma, maior será a competição entre eles para fecundar os óvulos e maior será a porcentagem de fertilização (FREITAS, 1997). Cada semente é resultado de um simples pólen germinado e fertilizado. Para um desenvolvimento normal dos frutos, milhares de grãos de pólen necessitam ser depositados no estigma para produzir centenas de sementes (ZITTER *et al.*, 1996), visto que apenas 2% dos grãos polinizados são responsáveis pela fertilização (ZAMIR e JONES, 1981).

As sementes se desenvolvem a partir de óvulos fertilizados. Durante o desenvolvimento, ocorrem modificações em algumas características físicas e fisiológicas, como tamanho, teor de água, conteúdo de matéria seca, capacidade de germinação e nível de vigor, até que a maturidade fisiológica seja atingida, a qual ocorre quando cessa a translocação de assimilados da planta para a semente (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Assim, após o óvulo ser fecundado, as sementes crescem em tamanho rapidamente, atingindo o máximo em período de tempo muito curto em relação à duração total do período de maturação. Isso ocorre devido à intensa divisão celular, acompanhada por alongamento das células que constituem o eixo-embrionário e o tecido de reserva. O eixo embrionário é a parte mais importante da semente, pois apresenta a capacidade de se desenvolver, devido à presença de tecido meristemático nas suas duas extremidades. Devido a este fato, apresenta condições de, através de divisões celulares, promover o crescimento deste eixo nos dois sentidos, o das raízes e o da plúmula, e originar uma plântula com condições de se fixar no solo e fotossintetizar as substâncias necessárias ao seu desenvolvimento (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O desenvolvimento das sementes pode ser dividido em três fases: a fase de histodiferenciação, onde são intensas as divisões celulares logo após a fertilização (embebição); a segunda fase caracterizada pelo aumento no acúmulo de matéria seca no endosperma e/ou embrião (preparação para o crescimento), seguida pela terceira fase, quando

ocorre a secagem ou dessecação, caracterizada pela redução no teor de água da semente (crescimento e desenvolvimento) (MARCOS FILHO, 2005).

O processo de desenvolvimento ou maturação da semente é controlado geneticamente e envolve uma sequência ordenada de alterações de várias naturezas, verificadas a partir da fecundação, até que as sementes se tornem independentes da planta-mãe. A preparação para a germinação é caracterizada pela síntese e acúmulo de reservas, posteriormente mobilizadas durante a germinação, conduzindo à retomada do crescimento do embrião e à formação de uma nova plântula (MARCOS FILHO, 2005). A semente por ser dreno, recebe os produtos da fotossíntese, o que resulta em aumento no conteúdo de matéria seca, representada por proteínas, açúcares, lipídios e outras substâncias, até atingir valor máximo, quando cessa a translocação planta-semente (DIAS, 2001). Um outro grupo de substâncias, cuja presença é constatada durante o desenvolvimento das sementes, é o dos fitohormônios, tanto os promotores como os inibidores de crescimento, que estariam relacionados com os fenômenos de dormência e germinação, representado pelas auxinas, giberelinas, citocininas e ácido abscísico (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Durante o período de formação da estrutura da semente, mediante a divisão, expansão e diferenciação celulares, ocorre o aumento no tamanho das sementes, porém o grau de umidade permanece constante e elevado, passando a decrescer à medida que as sementes acumulam reservas (MARCOS FILHO, 2005).

O desenvolvimento e a maturação das sementes são aspectos importantes a serem considerados na produção de sementes, pois entre os fatores que determinam a qualidade das sementes estão as condições do ambiente predominantes na fase de florescimento e frutificação e a colheita na época adequada. Logo, o conhecimento de como se procede a maturação das sementes e dos principais fatores envolvido é de extrema importância para auxiliar no controle de qualidade, sobretudo no que se refere ao planejamento e definição da época ideal de colheita (PESKE *et al.*, 2006).

## 2.8 Maturidade fisiológica

Após a fertilização, o óvulo sofre uma série de modificações, tanto em suas funções e forma como em sua fisiologia, originando a semente que, em seu estágio final de desenvolvimento, atinge o seu maior tamanho e maior peso. Nesse momento, as sementes atingem máxima germinação e vigor (PESKE *et al.*, 2006).

A ocorrência da maturidade fisiológica da semente é definida no período em que cessa o fluxo de substâncias fotossintetizadas da planta para a semente, ou seja, quando o conteúdo de matéria seca é máximo. Nessa fase, geralmente ocorre o ponto máximo de germinação e vigor, principalmente em espécies cujas sementes estão contidas em frutos carnosos, como é o caso das pimentas. Neste ponto, geralmente, a qualidade fisiológica (germinação e vigor) da semente é máxima e a deterioração é mínima (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

A partir do ponto de máxima matéria seca, não há mais conexão vascular entre a planta e a semente, e o teor de água das sementes que vinha decrescendo lentamente tende a diminuir drasticamente, até entrar em equilíbrio com o ambiente, comportamento este típico de sementes ortodoxas. Esta secagem natural é importante para evitar que, com a respiração intensa das sementes, ainda úmidas, ocorra a deterioração ou, então, que as sementes germinem no fruto. A velocidade de desidratação depende das condições climáticas durante o processo de maturação da semente e das características de cada espécie, sendo mais evidente em espécies de frutos secos em relação às de frutos carnosos (DIAS, 2001).

Teoricamente, o ponto ideal de colheita das sementes seria na maturidade fisiológica, caracterizada pelo máximo conteúdo de matéria seca, que pode coincidir ou não com a qualidade máxima da semente. Na etapa final do processo de maturação, as sementes perdem água sem que ocorram acréscimos significativos da massa de matéria seca.

Sementes recém-colhidas, quando úmidas, usualmente apresentam capacidade de germinação inferior à que exibiriam se fossem previamente secadas. Tal situação é também observada, quando se faz o armazenamento (repouso) dos frutos carnosos de algumas espécies como pimentão, abóbora, melancia, berinjela e pepino (MANTOVANI *et al.*, 1980; ARAÚJO *et al.*, 1981; ALVARENGA *et al.*, 1984; BARBEDO *et al.*, 1994a, 1994b).

É provável que, durante essa secagem, se verifique o desenvolvimento de processos essenciais à germinação. Essa técnica, quando empregada de forma correta, permite colheitas precoces, diminuindo o tempo de permanência no campo, e conseqüentemente evitando riscos com possíveis condições desfavoráveis, reduzindo também o número de colheitas, colhendo simultaneamente frutos em diversos estádios de maturação (BEWLEY e BLACK, 1985 citado por CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Três dias de repouso dos frutos de pimenta foram suficientes para se completar o processo de maturação (PINTO *et al.*, 1999). É importante salientar que frutos imaturos, de coloração verde, normalmente produzem sementes com baixo vigor e poder germinativo ou até mesmo inférteis (PINTO *et al.*, 1999). Em geral, a partir da maturidade fisiológica iniciam-se, nas sementes, alterações degenerativas que comprometem sua qualidade fisiológica (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Para a determinação da maturidade fisiológica das sementes de diferentes espécies têm sido utilizados diversos marcadores, como a mudança de coloração dos frutos (BARBEDO *et al.*, 1994b), tamanho dos frutos e massa das sementes (OLIVEIRA *et al.*, 1999; FESSEL *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2006) e teor de água (FESSEL *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2006). Logo, o não conhecimento do correto ponto de maturação fisiológica, conseqüentemente do melhor estádio de colheita de frutos de pimentas, pode ser uma das causas da baixa germinação e vigor das sementes. Sabe-se que para algumas espécies de *Capsicum*, o ponto de maturidade fisiológica ocorre por volta de 55 a 65 dias após a antese (DAA).

Comercialmente, os frutos de *Capsicum* são avaliados pela cor e pungência, embora todas as características de qualidade devessem ser levadas em consideração (MATTOS *et al.*, 2007). A cor dos frutos de pimenta relaciona-se mais diretamente com a percepção da aparência pelo consumidor, ao passo que a concentração de pigmentos pode estar mais diretamente relacionada com a maturidade. Logo, é de interesse que o produto apresente intensidade e uniformidade de coloração, a qual pode ser avaliada na casca e na polpa, por diferentes metodologias (CHITARRA, 1999). Os aparelhos mais utilizados pela sua sensibilidade são os espectrofotômetros e os colorímetros “tristimulus” com filtros desenhados para reproduzir a sensação psicofísica da percepção de cor pelo olho humano (MORETTI, 2006).

Avaliando a qualidade de sementes de pimentão sob a influência da maturidade do fruto, armazenamento e tratamento de maturação pós-colheita, concluiu-se que as sementes

extraídas de frutos que apresentaram maior peso seco e maior porcentagem de germinação foram os frutos maduros e os excessivamente maduros, colhidos aos 50 e 60 dias após a antese, respectivamente (SANCHEZ *et al.*,1993). Em estudos sobre a maturidade fisiológica de sementes de pimenta, cv. Amarela Comprida, concluiu-se que a maturidade fisiológica ocorreu aos 70 dias após a antese, quando as sementes possuíam teor de água de 46%. Observou-se também que a qualidade fisiológica das sementes foi máxima entre 65 e 70 dias após a antese (DAA), quando os frutos estavam com a cor vermelha e vermelha intensa, respectivamente, indicando que a colheita deve ser feita a partir desta faixa (VIDIGAL, 2008).

Em geral, apesar das variações, é consenso que a maturidade fisiológica de sementes de pimentão (*C. annuum* L.) ocorra por volta dos 55 dias após a antese, logo, são adotados também para as pimentas, em função do parentesco botânico, apesar das condições de temperatura e umidade relativa de cada local de produção influenciar nesse período de maturidade fisiológica das sementes.

## **2.9 Produção de sementes de pimenta**

A produção de mudas de hortaliças, etapa inicial do processo produtivo, é uma atividade que requer tecnologia apropriada e profissionais especializados, garantindo assim plantas mais saudáveis e produtivas (MINAMI, 1995). A produção de sementes de pimentas pode ser desenvolvida nas mesmas regiões e sob as mesmas condições de clima e solo recomendadas para a produção de frutos. É desejável, entretanto, buscar uma época do ano com temperaturas e umidades relativas mais baixas, para se evitar a elevada ocorrência de pragas e doenças. O clima ameno não prejudica a produção e contribui para a obtenção de sementes de alta qualidade, com menores riscos de perda de produção (ALVARENGA e SILVA, 1984).

A qualidade da semente utilizada no processo de produção é um dos principais fatores a ser considerado para a implantação do campo de produção (NASCIMENTO, 1991).

A época de semeadura é condicionada às peculiaridades climáticas de cada região. Sendo assim, a técnica de cultivo protegido (casa de vegetação) é utilizada em locais ou épocas, quando as condições climáticas, principalmente temperatura, distribuição e intensidade das chuvas e velocidade dos ventos, podem interferir no desenvolvimento das plantas ou na qualidade dos produtos (ANDRIOLO, 2000).

A semeadura deve ser feita com sementes de boa qualidade genética, física, fisiológica e fitossanitária. As mudas podem ser produzidas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) ou polipropileno (plástico), com substrato adequado para a produção de mudas. Atualmente, existe uma tendência das bandejas de isopor serem substituídas por bandejas de plástico por apresentarem vantagens como maior facilidade de higienização, maior número de células, além de maior durabilidade. Além dos tratamentos culturais normais, algumas práticas específicas podem ser aplicadas à produção de sementes, para alcançar melhores resultados como o estaqueamento, a desbrota, a eliminação de plantas atípicas da mesma espécie ou de outras espécies silvestres (ALVARENGA e SILVA, 1984).

Na produção de sementes híbridas, a flor emasculada (sem as anteras) deve ser protegida por saquinho de papel encerado ou rolete de papel alumínio, até o momento da polinização. Esta deve ser efetuada de preferência em dias claros, e pouco vento e, sobretudo, no final da manhã, para melhorar a eficiência de fertilização (CASALI *et al.*, 1984).

Para algumas cultivares, a colheita dos frutos pode ser iniciada aproximadamente aos 60 dias após o florescimento ou quando mais de 80% deles estiverem mudando de cor (CORREIA, 1984). Recomenda-se, após a colheita, o repouso dos frutos por três dias, a sombra e a temperatura ambiente para uniformizar a maturação e facilitar a sua extração (MEDINA 1984). Sugere-se fazer primeiramente a extração de sementes dos frutos mais maduros (coloração vermelha) e posteriormente dos frutos que estão em repouso. As principais características a serem observadas e mantidas na fase de colheita, visando à qualidade do produto final, são o tamanho, o formato característico dos frutos da cultivar, a ausência de defeitos e a boa condição fitossanitária (ALVARENGA e SILVA, 1984).

Em frutos carnosos é necessário extrair as sementes antes do beneficiamento, sendo recomendado um período de repouso pós-colheita dos frutos entre 7 e 20 dias antes da extração, para que as sementes completem sua maturação ainda dentro dos frutos. Os frutos devem ser armazenados em locais frescos, sombreados e protegidos (FREITAS *et al.*, 2008).

A extração das sementes pode ser feita a seco ou por via úmida. O primeiro processo é conduzido manualmente, sendo mais indicado para obtenção de sementes em pequena escala. A extração via úmida é feita mecanicamente e requer equipamentos para o esmagamento dos frutos, sendo mais utilizada em escala comercial (GEORGE, 1985). Entretanto, sementes extraídas manualmente são de melhor qualidade, pela ausência de danos mecânicos, além de permitir melhor aproveitamento da polpa pela agroindústria (ALVARENGA e SILVA, 1984).

O processo de secagem exige cuidados especiais. As sementes ainda úmidas devem ser colocadas para secar a sombra, em ambiente fresco e ventilado, perdendo lentamente a umidade superficial para o ambiente. Nessa fase inicial, é necessária a movimentação das sementes. A temperatura não deve ultrapassar os 30°C, sob pena de danificação no sistema de membranas das células embrionárias. Uma vez eliminada a umidade superficial, as sementes devem ser transferidas para estufas elétricas reguladas a 38°C, onde devem permanecer de 24 a 48 horas até atingirem grau de umidade próximo a 6% (CORREIA, 1984).

A avaliação da qualidade das sementes constitui um fator fundamental e de grande valia para os diversos segmentos que compõem o sistema de produção de sementes. As análises de pureza física e da qualidade fisiológica (teste de germinação e vigor), bem como a determinação do grau de umidade e o teste de sanidade, são essenciais e exigidas pela fiscalização para a comercialização das sementes (MARCOS FILHO *et al.*, 1987). Esses testes são, portanto, componentes essenciais de programas de controle de qualidade, tendo em vista evitar o manuseio e a comercialização de sementes de qualidade inadequada. Esse controle se estende às fases de produção e de comercialização, sempre com o objetivo maior de garantir a identidade genética dos materiais e também de preservar a qualidade fisiológica, sanitária e pureza física das sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O vigor das sementes é reflexo de um conjunto de características que determinam seu potencial fisiológico, ou seja, a capacidade de apresentar desempenho adequado quando expostas a diferentes condições de ambiente. Dada sua importância, vários métodos têm sido propostos visando à avaliação do potencial fisiológico das sementes, de modo a obter estimativa segura do desempenho dos lotes de sementes no campo e/ou armazenamento (MARCOS FILHO, 1999).

Dentre os diferentes testes de vigor disponíveis na atualidade, o de envelhecimento acelerado tem apresentado resultados confiáveis, uma vez que avalia o comportamento das

sementes quando submetidas a condições de estresse, procurando, assim, estimar o potencial relativo de armazenamento dos lotes, apresentando resultados relacionados à emergência de plântulas em campo (BHERING *et al.*, 2006). Este teste tem como base o fato de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente pela sua exposição à temperatura e umidade relativa elevadas, sendo estes os fatores ambientais mais relacionados à deterioração das sementes (MARCOS FILHO, 1999). Desse modo, lotes de sementes com alto vigor manterão sua viabilidade após serem submetidos ao estresse, enquanto os de baixo vigor terão sua viabilidade reduzida.

Vários estudos sugerem os testes de envelhecimento acelerado e deterioração controlada, em pimentões, como os mais indicados para classificar os lotes de sementes em função dos níveis de vigor (PANOBIANCO e MARCOS FILHO, 1998; TORRES e MINAMI, 2000).

A embalagem correta das sementes contribui para a preservação das qualidades originais do lote, fazendo com que cheguem perfeitas ao destino e apresentem um bom desempenho fisiológico na nova semeadura. As sementes de pimentas devem ser embaladas em embalagens herméticas (latas ou sacos de papel aluminizado) com grau de umidade próximo de 6%. Nessa condição, o seu poder germinativo normalmente fica garantido pelo prazo de três anos (POPINIGIS, 1985).

O armazenamento deve ser feito de preferência em ambiente refrigerado, com temperatura próxima a 4°C, se as sementes estiverem acondicionadas em embalagens herméticas. As sementes resfriadas reduzem o nível interno de atividade metabólica, consomem menos energia através da respiração e mantêm a sua viabilidade por períodos mais prolongados (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

No entanto, é sabido que a associação da colheita de sementes no ponto de maturidade fisiológica e os processos de extração, secagem, beneficiamento, tratamento, acondicionamento e armazenamento, estão intimamente ligados à qualidade fisiológica das mesmas, de modo que se devem determinar quais as condições ideais de colheita e secagem das mesmas. A operação de secagem é necessária porque o alto teor de água durante o armazenamento, é uma das principais causas da perda do poder germinativo e do vigor das sementes, podendo afetar a qualidade da semente não só no período de armazenamento, mas também durante as operações de beneficiamento (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

## 2.10 Melhoramento genético de pimentas e pimentões

O programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças é focado para atender à demanda do setor privado de sementes, desenvolvendo cultivares de pimentas ardidas com características para processamento e produção de páprica. A pesquisa em desenvolvimento com pimentas envolve a multiplicação de coleção de germoplasma, caracterização morfológica, citogenética e molecular. Conservação, documentação e avaliação de resistência a doenças e melhoramento de plantas também são realizados pela instituição (CARVALHO *et al.*, 2009b).

O pimentão doce tem sido foco de programas de melhoramento há várias décadas no Brasil. Programas de melhoramento do setor público criaram uma grande parte dos materiais plantados até a década de oitenta. As cultivares da série Agrônômico, desenvolvidas no Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), foram, e algumas ainda são, de grande importância para a produção nacional. São cultivares resistentes ao mosaico (causada por um vírus do gênero Potyvirus). Esta doença surgiu no Estado de São Paulo, na década de sessenta, e inviabilizou o cultivo de pimentão na região por alguns anos (IAC, 1997). Também foram conduzidos programas de melhoramento de pimentão na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e na Embrapa Hortaliças (RIBEIRO e CRUZ, 2002).

O conhecimento da diversidade entre os indivíduos é extremamente importante no melhoramento genético visando o gerenciamento da variabilidade genética disponível, por meio da escolha dos genitores a serem utilizados nos cruzamentos, podendo assim maximizar a heterose. Além disso, o estudo da diversidade entre linhagens possibilita o seu arranjo em grupos que, quando entrecruzados, podem resultar em maiores resultados de heterose (SOUZA, 2001).

A análise da diversidade genética se destina à identificação de genótipos duplicados em bancos de germoplasma assim como na identificação de genitores adequados à obtenção de híbridos com maior efeito heterótico. Entretanto, é preciso cautela na avaliação da divergência genética, visto que dois genótipos podem ser completamente distantes

geneticamente e ainda assim serem bastante relacionados, por serem membros da mesma população (CRUZ e CARNEIRO, 2003).

O híbrido é definido como aquele indivíduo heterozigótico para um ou mais loci originário da fusão de gametas geneticamente diferentes (BORÉM, 1998). O vigor híbrido (heterose) de *Capsicum annuum* têm sido explorado economicamente devido à frequência com que ocorre na primeira geração dos cruzamentos entre cultivares.

A heterose tem sido definida como a tendência de indivíduos obtidos por cruzamento em ultrapassar seus genitores endogâmicos e suas gerações endogâmicas em alguns aspectos (JONES, 1958). Assim, plantas mais vigorosas e produtivas são geralmente obtidas em gerações F1 de hortaliças, como é o caso das pimentas e pimentões. Em hortaliças tem sido possível explorar a heterose em espécies alógamas como melão, melancia, abóbora, pepino, couve-flor, brócolo, repolho, cenoura e cebola (PEARSON, 1983) assim como em autógamas como tomate (MIRANDA, 1978), pimentão (IKUTA e VENCOVSKY, 1970) e berinjela (IKUTA, 1961).

No mercado existe um predomínio de híbridos de pimentão que se caracterizam pela resistência múltipla a doenças (herdada dos dois pais), alto vigor, precocidade e uniformidade de produção e alta produtividade. Além das tradicionais cultivares de frutos verdes e vermelhos quando maduros, existe no mercado um grande número de híbridos coloridos, em cores que variam do marfim, púrpura, creme, amarelo e laranja. Dentre as companhias de sementes que comercializam sementes de pimentão se destacam a Sakata-Sudameris, a Hortices, a SVSeeds, a Syngenta, a Topseed, a Petoseed, a Isla e a Hortec (REIFSCHNEIDER, 2000). As vantagens na utilização de híbridos estão fundamentadas na combinação de diferentes caracteres qualitativos e quantitativos, como por exemplo, a reunião no híbrido de genes de resistência às diferentes doenças que se encontram separados nos genitores envolvidos, o que propicia uma maior homeostase e a possibilidade de exploração da heterose para caracteres importantes como produtividade e qualidade do produto final (IKUTA e VENCOVSKY, 1970).

Nos últimos vinte anos, o programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças tem-se concentrado principalmente na resistência múltipla a doenças como murcha-de-fitóftora (*Phytophthora capsici*), mancha-bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria), murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), mosaico (PVY) e vira-cabeça (TSWV). Como

resultado deste trabalho, foram liberadas linhagens que estão sendo utilizadas tanto no Brasil como no exterior, a exemplo da linhagem CNPH 148, resistente à murcha-de-fitóftora (usada como fonte de resistência pela Hortíferes), e da linhagem CNPH 703, padrão mundial de resistência estável e durável a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Estudos sobre hortaliças realizados no Estado de São Paulo, tem constatado que a principal demanda levantada por extensionistas foi à necessidade de novas cultivares resistentes a pragas e doenças, mais produtivas e mais adaptadas às condições locais de cultivo (RIBEIRO e CRUZ, 2002).

### **2.10.1 Cultivares de pimenta**

A maioria das cultivares de pimentas plantadas no Brasil como a 'Malagueta' (*C. frutescens*), 'Dedo-de-Moça' (*C. baccatum*), 'Cumari' (*C. baccatum* var. *praetermissum*), 'De Cheiro' e 'Bode' (*C. chinense*), são consideradas variedades botânicas ou grupos varietais, com características de frutos bem definidas (CARVALHO *et al.*, 2006). Normalmente, o produtor produz sua própria semente, e as diferenças existentes dentro destes grupos estão relacionadas às diferentes fontes de sementes utilizadas para o cultivo (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

São poucos os programas nacionais de melhoramento de pimentas. Destes, destaca-se o desenvolvimento de cultivares de pimenta doce destinadas ao processamento industrial, como páprica doce e pimenta picante dos tipos 'Jalapeño' e 'Cayenne' para molhos líquidos, coordenado pela Embrapa Hortaliças. Existem no mercado cultivares e híbridos de pimenta 'Jalapeño' que variam em função da pungência, precocidade, resistência a doenças e produtividade. Os híbridos, além de serem mais uniformes, apresentam plantas mais vigorosas e mais produtivas (REIFSCHNEIDER *et al.*, 2000). Os fatores que provavelmente restringem trabalhos de melhoramento com pimentas advêm da dificuldade de se manusear as pequenas flores para a execução dos cruzamentos e multiplicação das sementes. Além da produção escassa de sementes por frutos, uma vez que estes normalmente são muito pequenos e extremamente picantes, dificultando a extração das sementes. Outro fator importante é a área consideravelmente pequena de produção de pimentas, que implica no desinteresse das

empresas de sementes de produzirem e comercializarem sementes (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

## 2.11 Marcadores moleculares

Marcadores constituem importantes ferramentas para o melhoramento vegetal. Basicamente existem dois tipos de marcadores: os morfológicos e os moleculares (TANKSLEY, 1983). Atualmente o uso dos marcadores morfológicos está limitado, embora já foi amplamente utilizado. Marcadores moleculares são mais efetivos e podem oferecer alto polimorfismo por ‘locus’ estudado, enquanto os morfológicos apresentam baixo nível de polimorfismo (KONGKIATNGAM *et al.*, 1995). Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas e cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo cuja sequência e função, na maioria das vezes, são desconhecidas (GOSTIMSKY *et al.*, 1999). Ainda podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso como no caso dos marcadores isoenzimáticos, ou um segmento de DNA codificante ou não, no caso dos marcadores moleculares baseados em DNA. Marcadores moleculares de DNA correspondem a segmentos de DNA fisicamente ligados a ‘loci’ que determinam características de interesse (FALEIRO, 2007).

Ultimamente, os avanços na área da genética e biologia molecular têm sido substanciais, principalmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, foram desenvolvidas importantes técnicas para o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores genéticos moleculares (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007).

Em programas de melhoramento genético, a caracterização da diversidade genética por meio de marcadores moleculares, seja de coleções de trabalho ou de populações naturais, é um método rápido e eficiente para selecionar os parentais que constituirão as populações segregantes para características de interesse. Estas populações são formadas cruzando-se plantas superiores e geneticamente/fenotipicamente divergentes, buscando maximizar combinações heteróticas envolvendo grupos de genes co-adaptados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). O uso dos marcadores moleculares é uma técnica aplicável ao

estudo da diversidade genética de uma espécie e de características de uso em programa de melhoramento vegetal e em programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos, permitindo gerar grande quantidade de informações sobre a semelhança genética e o relacionamento filogenético em determinado germoplasma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A caracterização molecular da diversidade genética do banco de germoplasma, por exemplo, pode auxiliar o melhorista na seleção dos progenitores dentro de populações básicas, objetivando o estabelecimento de programas de melhoramento. Uma vez caracterizado o banco de germoplasma disponível, o melhorista pode escolher genotipicamente os genitores dos cruzamentos, tanto com o objetivo de maximizar a segregação de genes de importância agrônômica, como restringir essa segregação a poucos genes. Com a escolha dos genitores, será possível identificar os recombinantes desejados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O emprego de marcadores moleculares gera uma grande quantidade de informações que, associada a características fenotípicas, permitem o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos de forma rápida e muito eficiente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

No melhoramento de *Capsicum* da Embrapa, marcadores moleculares têm sido utilizados para detecção de teor de capsaicina (pungência), identificação para genes de carotenóides, resistência a fitóftora e ao vira-cabeça, causada pelo tospovirus GRSV (Groundnut Ringspot Vírus), estes procedimentos podem acelerar o processo de obtenção de novas combinações gênicas que levem à síntese de variedades superiores (RIBEIRO e REIFSCHNEIDER, 2008). A obtenção de cultivares de pimenta do tipo jalapeño mais produtivas, com alto conteúdo de capsaicinóides, maturação concentrada, fácil destaque durante a colheita, resistência a viroses e mais adaptadas às condições edafoclimáticas do Brasil Central, é o principal objetivo do programa de melhoramento da Embrapa neste segmento (RIBEIRO e REIFSCHNEIDER, 2008).

Atualmente, têm sido utilizados em genética os marcadores de DNA. As técnicas moleculares de análise do DNA são ferramentas auxiliares aos descritores morfológicos convencionais, que permitem aos pesquisadores acessar a variabilidade genética dentro e entre espécies, tendo o potencial de auxiliar na identificação de novas fontes de variabilidade

e de utilidade no desenvolvimento de novas cultivares de pimenta (PRINCE *et al.*, 1995; RODRIGUEZ *et al.*, 1999).

As técnicas de marcadores moleculares são classificadas em técnica de hibridização e técnica de amplificação, conforme seu modo de ação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). As técnicas baseadas na reação de polimerização em cadeia (PCR) têm como princípio a amplificação do DNA, isto é, a multiplicação de fragmentos de DNA a partir de alguma sequência conhecida. Esta técnica e suas derivações facilitam o entendimento dos processos biológicos fundamentais nas áreas aplicadas envolvendo o melhoramento genético. A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da técnica de PCR tornaram-a particularmente útil nos estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer tipo de organismo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o advento das técnicas modernas da biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético. Desta forma mapas genéticos desenvolvidos até então a partir de marcadores morfológicos e isoenzimáticos puderam ser saturados com o uso de marcadores moleculares (FALEIRO, 2007).

Marcadores moleculares revelam as diferenças genéticas entre indivíduos da mesma espécie ou de diferentes espécies, e estes são chamados de polimórficos. Marcadores polimórficos se dividem em dominantes e codominantes. Marcadores dominantes apresentam-se com presença ou ausência de alelo mostrando apenas um dos alelos em um determinado loco, não sendo possível a identificação de indivíduos heterozigotos. Já os marcadores codominantes tem a capacidade de apresentar as diferenças entre os tamanhos dos alelos, podendo apresentar todos os alelos presentes em um determinado loco (COLLARD *et al.*, 2005). A obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou do animal ou a partir de cultura de células ou de tecidos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente e a possibilidade de gerar maior quantidade de informações genéticas por loco no caso de marcadores co-dominantes, são prerrogativas dos marcadores moleculares (FALEIRO, 2011).

Vários tipos de marcadores têm sido utilizados para construção de mapas de ligação para diversas espécies de plantas (COLLARD *et al.*, 2005). Cada marcador possui características próprias, suas vantagens e desvantagens (Tabela 1).

**Tabela 1** - Comparação entre os principais tipos de marcadores moleculares utilizados na construção de mapas de ligação em plantas (CARNEIRO e VIEIRA, 2002).

Características	Marcadores			
	RFLPs	RAPDs	SSRs	AFLPs
<b>Tipo de Marcador</b>	Codominante	Dominante	Codominante	Dominante
<b>Número de alelos/loco</b>	Multialélico	2	Multialélico	2
<b>Nível de polimorfismo</b>	Alto	Alto	Muito alto	Muito alto
<b>Necessidade de procedimentos prévios</b>	Construção de bibliotecas genômicas ou de cDNAs	Não há	Desenho de primers	Não há
<b>Quantidade de DNA necessária</b>	10 mg	25 ng	50 ng	500 ng
<b>Marcação radioativa</b>	Sim/Não	Não	Não	Sim/Não
<b>Reprodutibilidade</b>	Alta	Média	Alta	Média
<b>Investimento</b>	Alto	Médio	Alto	Médio

Os marcadores co-dominantes contribuem com informações valiosas sobre número e frequência alélica em determinado loco de uma população ou grupo de indivíduos, além da porcentagem de heterozigidade dos locos de cada indivíduo analisado. De um modo geral, marcadores moleculares multilocos utilizados em DNA *fingerprinting*, como RAPD, AFLP, Microsatélites e Minissatélites, são mais adequados para estudos de identidade genética, estudos de variabilidade dentro da mesma espécie e testes de paternidade (FALEIRO, 2007).

Os diversos tipos de marcadores moleculares têm permitido estudos de evolução, de identidade, origem e diversidade genética inter e intraespecífica e identificação de novas variantes, gerando informações significantes para subsidiar distintas ações de pesquisa, sobretudo àquelas relacionadas aos programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos e programas de melhoramento animal e vegetal (FALEIRO, 2011).

Embora exista uma infinidade de marcadores moleculares, a primícia da análise desses marcadores é a mesma. Os marcadores comuns aos acessos significam semelhantes e os marcadores não comuns significam diferenças genéticas. Os dados gerados sobre semelhanças e diferenças genéticas entre acessos, promovem uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética, bem como os relacionamentos filogenéticos entre eles. Estas informações representam uma amostra significativa do genoma de cada material genético, sem influência do ambiente (FALEIRO, 2011).

Os marcadores moleculares podem ser baseados em análises de restrição ou amplificação de DNA. Na primeira categoria são analisados os polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP – ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’). Para os marcadores de amplificação de DNA estão os do tipo AFLP (‘Amplified Fragment Length Polymorphism’), RAPD (‘Random Amplified Polymorphic DNA’), SSR (‘Simple Sequence Repeat’) e RGA (‘Resistance Gene Analogs’). Entre outras vantagens, os marcadores moleculares apresentam a grande vantagem de poderem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, desde que sejam obtidas quantidades suficientes de DNA, permitindo assim acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejados. Com isso reduz-se o tempo necessário para completar uma geração e conseqüentemente, aumenta a eficiência dos programas de melhoramento (CARNEIRO e VIEIRA, 2002).

A existência de um marcador molecular de diagnóstico precoce de plantas pungentes e não pungentes de *Capsicum* também contribuirá para o aumento de eficiência dos programas de melhoramento. A capsaicina foi identificada e isolada em 1876 como a substância responsável pelo ardor das pimentas. Apesar de mais de um século de pesquisas existem controvérsias quanto aos resultados. De acordo com os artigos mais antigos, o controle genético da pungência é conferido por um gene dominante, enquanto os atuais atribuem a herança dessa característica a poucos genes de efeito mais pronunciado e à existência de um complexo poligênico que regula a sua expressão (SACCARDO, 1992).

## **2.12 Marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA**

### **2.12.1 Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP**

A técnica de AFLP tem sido utilizada para a construção de mapas genéticos desde seu desenvolvimento, principalmente em plantas cultivadas que apresentam baixo polimorfismo (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998).

Esta técnica é baseada na rapidez e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR, combinada com a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com

enzimas de restrição. Além da reprodutibilidade, confiabilidade e ser razoavelmente rápida, gera um grande número de marcadores moleculares (FALEIRO, 2011).

Na análise de AFLP, o DNA genômico deve ser inicialmente clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro (reconhecendo de 6-8 pb) e outra de corte frequente (reconhecendo 4 pb), sendo uma de cada vez. Em seguida, adaptadores específicos são ligados às extremidades dos fragmentos genômicos. Uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando 'primers' para os adaptadores. Finalmente, os fragmentos são separados em gel (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998).

Marcadores AFLP são dominantes, e não exigem conhecimento prévio da sequência de DNA, embora a técnica seja um pouco mais complexa e exige quantidades maiores de DNA e de melhor qualidade do que às outras técnicas. Assim, tem a capacidade de gerar grandes quantidades de fragmentos (FALEIRO, 2011).

### **2.12.2 Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD**

A técnica de RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990) utiliza-se de uma reação de PCR (Polymerase Chain Reaction), a qual se baseia no anelamento e extensão de um par de iniciadores (*primers*) que são pequenas moléculas de DNA de fita simples, que delimitam a sequência-alvo da molécula de DNA (WELSH e MCCLELLAND, 1990). A amplificação do fragmento de DNA é feita de modo exponencial e, devido à grande quantidade produzida, o fragmento de DNA pode ser visualizado a olho nu, por meio de corante específico (brometo de etídio), como uma banda em gel de agarose. RAPD tem como característica ser marcador dominante, isto é, identifica o alelo dominante pela presença de banda e o alelo recessivo pela ausência de banda (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Esta técnica utiliza '*primers*' mais curtos (decâmeros) e de sequência arbitrária, eliminando a necessidade de conhecimento prévio da sequência. Normalmente usa-se apenas um tipo de '*primer*' em cada reação, sendo este formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com conteúdo de G + C entre 50 e 70% (FRITSCH e RIESEBERG, 1996). Desta forma, a reação de RAPD ocorre devido ao anelamento do

‘*primer*’ único em pontos próximos do genoma, delimitando a região que será amplificada (WELSH e MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990).

O polimorfismo de RAPD gerado em função da homologia do iniciador com a sequência de DNA genômico (geralmente dez nucleotídeos) é sensível a pequenas mudanças nas sequências do sítio de iniciação. Os marcadores RAPD detectam uma grande quantidade de polimorfismos em virtualmente todo o genoma, amostrando inclusive regiões de DNA repetitivo (WILLIAMS *et al.*, 1990). Por estas razões, a técnica de RAPD tem sido eficientemente empregada nos estudos de divergência genética em que os indivíduos analisados são geneticamente próximos, ou seja, pertencem a uma mesma espécie (HALEY *et al.*, 1994).

A reprodutibilidade dos resultados requer otimização e estrito controle das condições da reação, considerados pontos chave, juntamente com a concentração de DNA, de cloreto de magnésio e da enzima DNA polimerase. O uso de BSA pode ser adotado, principalmente quando o DNA obtido não é muito puro (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Além disso, a temperatura de anelamento e a qualidade da agarose, também podem afetar o número de ampliações bem como a sua intensidade e separação (GOSTMISKY *et al.*, 1999).

Marcadores RAPD são tipicamente dominantes e apresentam uma boa capacidade multiplex, identificando um bom número de ‘loci’ polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por ‘locus’ (dois alelos: amplificado e não-amplificado), entretanto é considerada uma técnica altamente acessível, por ser rápida e de baixo custo (WILLIAMS *et al.*, 1990).

As principais desvantagens dos marcadores RAPD é sua herança dominante e seu caráter anônimo, ou seja, indivíduos homozigotos dominantes não podem ser diferenciados dos heterozigotos. Neste último caso, não se pode determinar se um produto da amplificação (banda ou amplicon) em um gel de RAPD é resultado da amostragem de uma mesma região do genoma (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH e MCCLELLAND, 1990).

O emprego de um grande número de marcadores nas progênies em avaliação tem sido a solução encontrada para contornar o problema da dominância e do caráter anônimo dos marcadores RAPD (RITLAND e JAIN, 1981). Recentemente, marcadores RAPD têm sido

utilizados, com sucesso, para estimativas de taxa de cruzamento de espécies alógamas (GAIOTTO *et al.*, 1997).

Diversos trabalhos foram realizados em *Capsicum* visando ao estudo da diversidade genética por meio da avaliação de caracteres morfo-agronômicos, (OLIVEIRA *et al.*, 1999; MOURA *et al.*, 1999; SUDRÉ *et al.*, 2005), ou ainda pela utilização de marcadores moleculares (PARAN *et al.*, 1998; RODRIGUEZ *et al.*, 1999; SANWEN *et al.*, 2000; TOQUICA *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004).

Através da técnica de RAPD alguns autores estudaram o grau de similaridade entre dez acessos de pimenta (*Capsicum annuum*) da Tailândia. Os acessos apresentaram similaridades entre 20 e 90%, com formação de dois grupos maiores, consistentes com as características morfológicas (SITTHIWONG *et al.*, 2005).

### **2.12.3 Microssatélites ou Simple Sequence Repeat - SSR**

Os marcadores microssatélites são sequências de nucleotídeos repetidas lado a lado, cuja unidade de repetição varia de um a seis pares de base (WEBER e MAY, 1989; TAUTZ, 1989). São encontrados abundantemente em uma ampla diversidade de espécies de eucariotos e procaríotos e no genoma cloroplastidial de plantas (JARNE e LAGODA, 1996).

Nos organismos eucariotos, o genoma apresenta diferentes classes de sequências repetidas e estas podem ser classificadas de acordo com sua extensão em satélites, minissatélites e microssatélites (JARNE e LAGODA, 1996).

Os microssatélites ou SSR se encontram distribuídos ao longo dos genomas de plantas e animais, podendo ou não estar associados a genes (HAMADA *et al.*, 1982). Desta forma, os microssatélites podem ser classificados em mononucleotídicos, dinucleotídicos, trinucleotídicos, etc.

Marcadores microssatélites são ferramentas indicadas para uma análise genômica detalhada, caracterizam-se por ser co-dominantes, ou seja, em cada loco analisado é possível distinguir homocigotos e heterocigotos, assim como identificar o genótipo específico de cada

indivíduo de acordo com os alelos presentes na população estudada; são multialélicos e bastantes estáveis. Uma vez obtidos os “*primers*” informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (FERREIRA *et al.*, 2007).

A amplificação de locos SSR é feita por PCR e os alelos de um loco são identificados por meio da migração relativa em gel de eletroforese. Os microssatélites caracterizam-se por serem altamente polimórficos, codominantes, seletivamente neutros, abundantes, informativos, aparentemente distribuídos por todo o genoma e dependem de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados (JARNE e LAGODA, 1996).

O uso de marcadores microssatélites, juntamente com a detecção dos fragmentos por fluorescência e a análise semi-automatizada, têm-se mostrado eficiente para diversos estudos como mapeamentos genéticos e estudos de diversidade genética (MITCHELL *et al.*, 1997). O uso da técnica de microssatélites marcados com fluorescência e detecção dos alelos semi-automática possui uma vantagem significativa em relação ao uso de detecção por microssatélites radioativos e gel de prata. Além de aumentar a eficiência e a precisão dos resultados, reduz riscos de exposição a radioisótopos e a íons de prata (MITCHELL *et al.*, 1997).

O polimorfismo revelado pelo microssatélite é suficientemente estável para ser usado em análises genéticas. O grande número de locos microssatélites e sua variabilidade elevada fazem deles ferramentas importantes para construção de mapas genéticos de alta resolução (HEARNE *et al.*, 1992).

Esta técnica requer grande trabalho na obtenção de uma biblioteca de fragmentos genômicos pequenos. Além da necessidade de pessoal técnico habilitado e equipamento sofisticado para o sequenciamento automático, tornando a técnica laboriosa e de alto custo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

O objetivo da pesquisa foi avaliar a qualidade genética e fisiológica de sementes de *Capsicum* sp., por meio de estudos relacionados com a taxa de cruzamento natural e determinação da maturidade fisiológica das sementes.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar a maturidade fisiológica de sementes de *Capsicum baccatum*, var. pendulum cv. BRS Mari em diferentes estádios de maturação.
- Avaliar a taxa de cruzamento natural entre dois acessos de *C. annuum* em condições de campo no Planalto Central do Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, E. M.; SILVA, R. F.; ARAÚJO, E. F.; CARDOSO, A. A. Influência da idade e armazenamento pós-colheita dos frutos na qualidade de sementes de melancia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.2, p.5-8, 1984.

ALVARENGA, E. M.; SILVA, R. F. Produção de sementes de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, v.10, n.113, p.63-70, 1984.

ANDRIOLO, J. L. Fisiologia da produção de hortaliças em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.26-32, 2000. Suplemento.

ARAUJO, E. F.; ARAUJO, R. F.; SOFIATTI, V.; SILVA, R. F. Maturação de sementes de Milho-Doce – Grupo Super Doce. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.2, p.69-76, 2006.

ARAÚJO, E. F.; MANTOVANI, E. C.; SILVA, R. F. Influência da idade e do armazenamento dos frutos na qualidade das sementes de abóbora. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 2º, Recife, set. 21-25, 1981. **Resumos...**, Brasília, ABRATES, p.82, 1981.

BARBEDO, A. S. C.; ZANIN, A. C. W.; BARBEDO, C. J.; NAKAGAWA, J. Efeitos da idade e do período de repouso pós-colheita dos frutos sobre a qualidade de sementes de berinjela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.12, n.1, p.14-18, 1994a.

BARBEDO, C. J.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, A. S. C.; ZANIN, A. C. W. Influência da idade e do período de repouso pós-colheita de frutos de pepino cv. Rubi na qualidade fisiológica de sementes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.12, n.2, p.118-124, 1994b.

BAYNES, J.; DOMINICZACK, M. H. **Bioquímica Médica**. São Paulo; Editora Manole, p.12-28, 2000.

BHERING, M. C.; DIAS, D. C. F. S.; VIDIGAL, D. S.; NAVEIRA, D. S. P. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.3, p.64-71, 2006.

BIANCHETTI, L. B. **Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes no Brasil**. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília- UnB, Brasília, 1996, 174 f. Dissertação de Mestrado em Botânica.

BILGER, W.; FISAHN, J; BRUMMET, W.; KOSSMANN, J.; WILLMITZER, L. Violaxanthin cycle pigment contents in potato and tobacco plants with genetically reduced photosynthetic capacity. **Plant Physiology**, v.108, p.1479-1486, 1995.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2 ed. Viçosa: UFV, 1998. 453p.

BOSLAND, P. W. Chiles: A diverse Crop. **HortTechnology**, v.2, n.1, p.7-10, 1992.

\_\_\_\_\_ Breeding for quality *Capsicum*. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v.12, p.25-31, 1993.

BOSLAND, P. W. *Capsicums*: Innovative uses of an ancient crop. In: J. Janick (ed.), **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, p.479-487, 1996.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers**: vegetable and spice Capsicums. Wallingford: CAB International, 1999, 204p.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers**: vegetable and spice Capsicums. Oxon: CABI Publishing, 2000, 204p.

BOTS, M.; MARIANI, C. **Pollen viability in the field**. **Radboud**: Universiteit Nijmegen, 2005. 52p. Disponível em: <<http://www.cogem.net/ContentFiles/CGM2005-05.pdf>>. Acesso em 12 nov 2012.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v.61, n.2, p.89-100, 2002.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: Funep, 2000.

CARVALHO, S. I. C.; RIBEIRO, C. S. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. 'BRS Mari': Nova cultivar de pimenta dedo-de-moça para processamento. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.4, p.571-573, 2009a.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, 2009b.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. **Pimentas de gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. (Documentos, n.94).

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: Ribeiro, C. S. C.; Lopes, C. A.; Carvalho, S. I. C; Henz, G. P.; Reifschneider, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.39-53, 2008.

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. **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal: teoria e prática**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.355-385, 2005.

CARVALHO, V. D. Características químicas de pimentões e pimentas. **Informe agropecuário**, v. 10 n.113, p.76-78, 1984.

CASALI, V. W. D.; COUTO, F. A. A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**, v.10, n. 113, p. 8-13, 1984.

CASALI, V. W. D.; STRINGHETA, P. C. Melhoramento de pimentão e pimenta para fins industriais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.10, n.113, p.23-25, 1984.

CASALI, W. D.; PÁDUA, J. G.; BRAZ, L. T. Melhoramento de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.10, n.113, p.19-22, 1984.

CHASAN, R.; WALBOT, V. Mechanisms of plant reproduction: questions and approaches. **The Plant Cell**, Waterbury, v.5, n.3, p.1139-1146, 1993.

CHITARRA, M. I. F. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. ver. e ampl. Lavras: UFLA, 1999.

COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUWER, J. B.; PANG, E. C. K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v.142, p.169-196, 2005.

CORREIA, L. C. Colheita, rendimento, classificação, embalagem e comercialização de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, v.10, n.113, p.70-72, 1984.

COSTA, C. J.; CARMONA, R.; NASCIMENTO, W. M. Idade e tempo de armazenamento de frutos e qualidade fisiológica de sementes de abóbora híbrida. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.1, p.127-132, 2006.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v.2, 2003, 585p.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer, p.1-11, 1990.

DIAS, D. C. F. S. Maturação fisiológica de sementes: o processo. **Seed News**, Pelotas, v.5, n.6, p.22-24, 2001.

DIAS, D. C. F. S.; RIBEIRO, F. P.; DIAS, L. A. S.; SILVA, D. J. H.; VIDIGAL, D. S. Maturação de sementes de tomate em função da ordem de frutificação na planta. **Revista Ceres**, Viçosa, v.53, n.308, p.446-456, 2006.

DORAI, T.; AGGARWAL, B. B. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. **Cancer Letters**, v.17, n.4, p.1263-1265, 2004.

DUMAS, C.; MOGENSEN, H.L. Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. **The Plant Cell**, Waterbury, v.5, n.3, p.1337-1348, 1993.

EMBRAPA. **Pimentas e pimentões: preservação da biodiversidade gera riquezas...** In: Hortinforme: Informativo Externo da Embrapa Hortaliças, n.11, p.4-5, 2002.

FALEIRO, F. G. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: Faleiro, F. G.; Andrade, S. R. M. de.; Reis Júnior, F. B. dos. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.31-52, 2011.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007, 102p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, 1996. 220p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos da caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.377-420, 2007.

FESSEL, S. A.; VIEIRA, R. D.; MENDONÇA, E. A. F.; CARVALHO, R. V. Maturação fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.1, p.191-197, 2001.

FOSKEY, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press, 1994, 580p.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M.; The biosynthesis and nutritional uses of Carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p.228-265, 2004.

FREITAS, B.M. Changes with time in the germinability of cashew (*Anacardium occidentale*) pollen grains found on different body areas of its pollinator bees. **Review of Brazilian Biology**, Rio de Janeiro, v.57, n.2, p.289-294, 1997.

FREITAS, R. A. de.; NASCIMENTO, W. M.; CARVALHO, S. I. C. de. Produção de sementes. In: Ribeiro, C. S. C.; Lopes, C. A.; Carvalho, S. I. C.; Henz, G. P.; Reifschneider, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.173-187, 2008.

FRITSH, P.; RIESEBERG, L. H. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith, TB, Wayne, RK (eds.) **Molecular genetic approaches in conservation**. New York. Oxford University Press, 1996.

GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.842-849, 1997.

GEORGE, R. A. T. **Tecnologia de las semillas de hortalizas**: guia tecnica de la produccion, procesamiento, almacenamiento y control de calidad de semillas de hortalizas. Roma: Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion, 1983, 117p.

GEORGE, R. A. T. **Vegetable seed production**. New York: Longman, 1985, 318p.

GOLSBY, R. A. **Kuby Imunologia**. 4 ed. Livraria e Editora Revinter Ltda. Rio de Janeiro, p.10-28, 2002.

GONÇALVES, E. M. D. Produção de pimenta em assentamento rurais no município de Campo Florido- MG. **I Encontro Nacional do Agronegócio Pimenta (*Capsicum sp.*)**. p.1-17, 2004. CD-ROM.

GOTMISKY, S. A.; KOKAEVA, Z. G.; BOBROVA, V. K. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. **Research Journal Genetics**, v.11, p.538-549, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M. E. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

GREENLEAF, W. M. **Pepper breeding**. in: BASSETT, M. J. (ed.) *Breeding Vegetable Crops*. Westport: AVI Publishing Company, p.67, 1986.

HALEY, S. D.; MIKLAS, P. N. AFANADOR, L.; KELLY, J.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.119, p.122-125, 1994.

HALLIWEL, B. **Free radical in biology and medicine**. 2 ed. Oxford University Press. p.12-16, 1999.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.79, p.6465-6469, 1982.

HEARNE, C. M.; GHOSH, S.; TODD, J. A. Microsatellites for linkage analysis of genetic-traits. **Trends in Genetics**, v.8, n.8, p.288-294, 1992.

HENZ, G. P.; COSTA, C. S. R. Alternativa rentável: como produzir pimenta. **Revista Cultivar Hortalica e Fruta**. 33 ed. 2005.

HIDALGO, R. Variabilidade genética y caracterización de especies vegetales. In: FRANCO, T. L.; HIDALGO, R. (Ed.). **Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos**. Roma: IPGRI, p.2-26, 2003.

IKUTA, H.; VENCOVSKY, R. **Ensaio de híbridos F1 de variedades de pimentão resistentes a viroses**. Piracicaba: ESALQ, Depto. Genética, p.62-64, 1970 (Relatório científico, n.4).

IKUTA, H. **Vigor de híbridos na geração F1 em berinjela (*Solanun melongena* L.)**. Piracicaba - SP: ESALQ, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1961, 41p. Tese de Doutorado.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Cultivares Elite 1997**. Campinas, IAC, 1997, 57p.

JARNE, P. e LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, v.11, n.10, p.424-429, 1996.

JONES, D. F. Heterosis and homeostasis in evolution and in applied genetics. **The American Naturalist**, Chicago, v.92, n.867, p.321-328, 1958.

KESSEL, R.G.; SHIH, C.Y. **Sanning eletron microscopy in biology**. New York: Springer-Vetlag, 1976, 345p.

KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M. J.; FORTIN, M. G. Genetic variation within between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme and RAPD markers. **Euphytica**, v.84, p.237-246, 1995.

KOUL, L. B.; KAPIL, A. Modernização tecnológica em alimentos. **Planta Médica**, v.59, p.413-417, 1993.

LEE, J. M.; NAHM, S. H.; KIM, Y. M.; KIM, B. D. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. **Theoretical and Applied Genetcs**. v.108, p.619-627, 2004.

LEE, J. J.; CROSBY, K. M.; PIKE, L. M.; YOO, K. S.; LESKOVAR, D. I. Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* sp.). **Scientia Horticulturae**, v.106, p.341-352, 2005.

LÚCIO, A. D.; SOUZA, M. F.; HELDWEIN, A. B.; LIEBERKNECHT, D.; CARPES, R. H.; CARVALHO, M. P. Tamanho da amostra e método de amostragem para avaliação de características do pimentão em estufa plástica. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.2, p.180-184, 2003.

LUZ, F. J. F. **Caracterizações morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* jacq.)**. Jaboticabal - SP: UNESP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007. Tese de doutorado.

MAISTRE, J. **Les plantes a épices**. Maisonneuve & Larose, 1964.

MANTOVANI, E. C.; SILVA, R. F.; CASALI, V. W. D.; CONDÉ, A. R. Desenvolvimento e maturação fisiológica de sementes de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Revista Ceres**, v.27, n.152, p.356-368, 1980.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987.

MARCOS FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. (FEALQ. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 12).

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, cap.1 e 3, p.1-24, 1999.

MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; HENZ, G. P. **Protocolos de avaliação da qualidade química e física de pimentas (*Capsicum* spp.)**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. (Comunicado Técnico, n.50).

MEDINA, P. V. L. Manejo pós-colheita de pimentões e pimentas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.10, n.113, p.72-76, 1984.

MINAMI, K. **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. São Paulo: T.A. Queiroz, 1995, 128p.

MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C. A.; HERNANDEZ, C. J.; SZEWC-MCFADDEN, A. K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, v.37, p.617-624, 1997.

MODLY, C. E. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, V.14, p.413-416, 1986.

MORETTI, C. L. **Protocolos de Avaliação da Qualidade Química e Física de Tomate**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. (Comunicado Técnico, n.32).

MOURA, W. M.; CASALI, V. W. D.; CRUZ, C. D.; LIMA, P.C. Divergência genética em linhagens de pimentão em relação à eficiência nutricional de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.2, p.217-224, 1999.

NAPOLEÃO, B. A. Futuro promissor para a cultura da pimenta: cultivo da pimenta. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.235, p.3, 2006.

NASCIMENTO, W. M. **Produção de sementes de olerícolas**. Pelotas: UFPel, 1991.

NASCIMENTO, W. M. Mercado de sementes de pimentas no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DO AGRONEGÓCIO PIMENTAS (*Capsicum* spp.), **Anais...** Brasília: Embrapa Hortaliças, 1, 2004. (CD-ROM).

NASCIMENTO, W. M.; DIAS, D. C. F. S.; FREITAS, R. A. Produção de sementes de pimentas: cultivo da pimenta. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.235, 2006.

NUEZ, V. F.; ORTEGA, G. R.; COSTA, G. J. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1996, 607p.

ODLAND, M. L.; PORTER, A. M. A study of natural crossing in peppers (*Capsicum frutescens*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.38, p.585-588, 1941.

OLIVEIRA, S. A. **Avaliação de nove linhagens de pimentão (*Capsicum annuum* L.) para fins industriais**. Viçosa: UFV, 1978, 50p. Dissertação de Mestrado.

OLIVEIRA, A. P.; GONÇALVES, C. P.; BRUNO, R. L. A.; ALVES, E. U. Maturação fisiológica de sementes de pimentão, em função de idade de frutos após a antese. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.2, p.88-94, 1999.

OLSZEWER, E. **Clínica Ortomolecular**. São Paulo: Rocca, 2000, 393p.

PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimentão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.20, n.2, p.306-310, 1998.

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

PERUCKA, L.; OLESZEK, W. Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v.7, p.189-192, 2000.

PEARSON, O. H. Heterosis in vegetable crops. In: FRANKEL, R. (Ed.). **Heterosis: reappraisal of theory and practice**. Berlin: Springer-Verlag, chap.6, p.138-188, 1983.

PESKE, S. T.; LUCCA FILHO, O. A.; BARROS, A. C. S. A. Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos. 2 ed. ver. e ampl. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, 2006, 470p.

PICKERSGILL, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). **Evolution**, v.25, n.4, p.683-691, 1971.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* sp. **Euphytica**, v.96, p.129-133, 1997.

PINTO, C. M. F.; SALGADO, L. T.; LIMA, P. C.; PIKANÇO, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; MOURA, W. M.; BROMMONSCHENKEL, S. H. **A cultura da pimenta (*Capsicum* sp.)**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1999. (Boletim Técnico, 56).

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1985, 289p.

PRINCE, J. P.; LACKNEY, V. K.; ANGELES, C.; BLAETH, J.; KYLE, M. M. A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the *fingerprinting* of pepper cultivars. **Genome**, Ottawa, v.38, p.224-231, 1995.

REID, M.S.; FUJINO, D.W.; HOFFMAN, N.E.; WHITEHEAD, C.S. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) – The transmitted stimulus in pollinated flowers? **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.3, p.189-196, 1984.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. ***Capsicum*. Pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000. 113p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C. de; HENZ, G. P. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa hortaliças, 2008. 200p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S. da C. Cultivo. In: Ribeiro, C. S. C.; Lopes, C. A.; Carvalho, S. I. C; Henz, G. P.; Reifschneider, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, Cap.1, p.11-14, 2008.

RIBEIRO, C. S. da C. Apresentação do Encontro Nacional do agronegócio pimentas (*Capsicum* sp.). In: ENCONTRO NACIONAL DO AGRONEGÓCIO, I, 2004. Brasília. **Anais...** Brasília: CNPH, 2004. 1 CD-ROM.

RIBEIRO, C. S. da C.; CRUZ, D. M. R. Tendência de mercado: comércio de pimentão em expansão. **Cultivar**, Pelotas, v.3, n.14, p.16-19, 2002.

RIBEIRO, C. S. da C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008, 200p.

RIBEIRO, C. S. da C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Genética e melhoramento. In: Ribeiro, C. S. C.; Lopes, C. A.; Carvalho, S. I. C.; Henz, G. P.; Reifschneider, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.55-70, 2008.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using “n” independent loci. **Heredity**, v.47, n.1, p.35-52, 1981.

RODRIGUES, J.D.; PEDRA, J.F.; RODRIGUES, S.D. **Fisiologia vegetal. Crescimento e desenvolvimento**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 1977.

RODRIGUEZ, J. M.; BERKE, T.; ENGLE, L.; NIENHUIS, J. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p. 147-156, 1999.

RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.235, p.7-15, 2006.

SACCARDO, F. Miglioramento del peperone. In: COLLANA ITALIA AGRICOLA. **Miglioramento genetico dei vegetali**. Roma: Reda, p.183-200, 1992.

SANCHEZ, V. M.; SUNDSTROM, F. J.; McCLURE, G. N.; LANG, N. S. Fruit maturity, storage and posharvest maturation treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. **Scientia Horticulturae**. Lousiana, v.54, n.3, p.191-201, 1993.

SANWEN, H.; BAOXI, Z.; DAN, M.; LINDA, C.; GUIMEI, Y.; JIAZHEN, G. Development of pepper SSR markers from sequence databases. **Euphytica**, v.117, p.163-167, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SIMONNE, A. H.; SIMONNE, E. H.; EITENMILLER, R. R.; MILLS, H. A. GREEN, N. R. Ascorbic acid and provitamin A contents in unusually colored bell peppers (*Capsicum annuum* L.) **Journal of Food Composition and Analysis**, v.10, p.299-311, 1997.

SITTHIWONG, K.; MATSUI, T.; SUKPRAKARN, S. Classification of pepper (*Capsicum annuum* L.) accessions by RAPD analysis. **Biotechnology**, Paquistão, v.4, n.4, p.305-309, 2005.

SOUZA, A. P. Biologia Molecular aplicada ao melhoramento. in: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos e melhoramento - Plantas**. Rondonópolis, MT: Fundação MT, cap.29, p.939-966, 2001.

SOUZA, R. J. ; SILVA, E. C.. **Cultura da Pimenta**. Lavras: Editora UFLA, Série Extensão, Ano VIII, n.56, 1999. (Boletim Técnico).

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M; AMARAL JÚNIOR., A. T. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.1, p.22-27, 2005.

SURH, Y. J.; LEE, E.; LEE, J. M. The Capsaicin Study. **Mutation Research**. v.41, p.259-267, 2002.

TANKSLEY, S. D. High rates of cross-pollination in chile pepper. **HortScience**, v.19, n.4, p.580-582, 1984.

TANKSLEY, S. D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.3-8, 1983.

TAUTS, D. **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic dna markers**. *Nucleic Acids Reserch*, v.17, n.16, p.6463-6471, 1989.

TOPUZ, A.; OZDEMIR, F. Influences of gamma irradiation and storage on the capsaicinoids of sun-dried and dehydrated paprika. **Food Chemistry**, v.86, p.509-515, 2004.

TOQUICA, S. P.; RODRÍGUEZ, F.; MARTINEZ, E.; DUQUE, M. C.; TOHME, J. Molecular characterization by AFLP of *Capsicum* germoplasm from the Amazon department in Colômbia, characterization by AFLPs of *Capsicum*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, p.639- 647, 2003.

TORRES, S. B.; MINAMI, K. Qualidade fisiológica de sementes de pimentão. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.1, p.109-112, 2000.

USP. **O que tem a flor a ver com o fruto?** 2003. Disponível em: <<http://darwin.futuro.usp.br/dandelions/24bio.pdf>>. Acesso em: 15 nov 2012.

VIDIGAL, D. S. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de pimenta em função do estágio de maturação dos frutos**. UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2008. Dissertação de mestrado em Fitotecnia.

VILELA, N. J.; RIBEIRO, C. S. C; MADAIL, J. C. M. **Eficiência técnico-econômico de quatro sistemas de produção de pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. (Comunicado Técnico, n.56).

WEBER, J. L. e MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction. **American Journal of Human Genetics**, v.44, n.3, p.388-396, 1989.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. *Fingerprinting* genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

WILDMAN, R. E. C. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. **Modern Nutrition**. p.209-234, 2000.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

YAHIA, E. M.; CONTRETAS-PADILHA, M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruit during development, maturation and senescence. **Lebensmittel Wissenschaft u-Technologie**, v.34, p.452-457, 2001.

ZAMIR, D.; JONES, R. A. Estimates of the number pollen grains applied a stigma in a single pollination. **Tomato Genetics Crops**, v.31, p.21, 1981

ZEWDIE, Y.; BOSLAND, P. W. Combining ability and heterosis for capsaicinoids in *Capsicum pubescens*. **HortScience**, v.36, n.7, p.1315-1317, 2001.

ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C.E. (ed.). **Compendium of cucurbit diseases** St. Paul: APS Press, 1996, 87p.

# CAPÍTULO 1

---

---

**Determinação da maturidade fisiológica de sementes de pimenta  
dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*)**

## **Determinação da maturidade fisiológica de sementes de pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*)**

### **RESUMO**

Um aspecto ainda pouco estudado, mas de grande relevância no processo produtivo de sementes de pimenta do tipo dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) é a determinação tanto da maturidade fisiológica quanto do momento mais adequado para a colheita. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade e a maturidade fisiológica de sementes de um acesso de *C. baccatum* var. *pendulum*. O experimento foi realizado nas instalações do campo experimental e laboratórios de sementes e de pós-colheita da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. Para a determinação da maturidade fisiológica foi utilizada a cultivar ‘BRS Mari’. As sementes foram obtidas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação (20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 dias após antese). Foram determinadas as seguintes características dos frutos: a coloração, o comprimento longitudinal, o teor de clorofila e de capsaicina. Nas sementes, foram determinados o grau de umidade, o teor de matéria seca, a germinação, a primeira contagem de germinação, a emergência em casa de vegetação e o envelhecimento acelerado. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para a maioria das variáveis analisadas. A maturidade fisiológica das sementes da cultivar ‘BRS Mari’ ocorreu aos 70 dias após a antese, onde os frutos apresentaram a coloração vermelha. Neste momento, a umidade das sementes foi de 39% e a germinação e emergência das plântulas foi de 88% e 77%, respectivamente. Notadamente, picos mais altos de capsaicina foram observados neste estágio fisiológico.

**Palavras-chave:** *Capsicum*, capsaicina, maturidade fisiológica, qualidade das sementes, vigor.

**Physiological maturity determination of lady's finger hot pepper (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) seeds.**

**ABSTRACT**

The determination of the physiological seed maturity as well as the most appropriate harvest time is an important aspect to achieve superior quality seeds. This information is still not available for seed production of lady's finger pepper (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) accessions. Thus, the objective of the present study was to evaluate the physiological seed quality and maturity of *C. baccatum* var. *pendulum* cv. 'BRS Mari'. The experiment was carried out at the experimental fields and seed and post-harvest laboratories at Embrapa Vegetables, Brasília-DF. Seeds were obtained from fruits harvested at different physiological maturity stages (20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 days after anthesis). For the fruits, the following traits were determined: color, longitudinal length, chlorophyll and capsaicin contents. For the seeds, the moisture content, dry matter, germination, first germination count, emergence under greenhouse conditions and accelerated aging were also evaluated. A completely randomized design (CRD) with four replications for most variables was used in this study. The physiological seed maturity of 'BRS Mari' occurred at 70 days after anthesis when the fruits showed red color. At this stage, seed moisture content was 39% and the germination and seedling emergence were 88% and 77%, respectively. Coincidentally, the highest of capsaicin accumulation was observed at this very same stage.

**Keywords:** *Capsicum*, capsaicin, physiological maturity, seed quality, vigor.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, pimentas do gênero *Capsicum* são cultivadas em diferentes regiões, em clima tropical como no Norte e Nordeste, ou clima subtropical como no Sul, tendo como os maiores produtores os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Ceará e Rio Grande do Sul (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Estima-se que o consumo diário de pimenta no país esteja em torno de meio grama por pessoa (EMBRAPA, 2002). As pimentas apresentam elevados teores de vitaminas e minerais (LINGUANOTTO, 2004). São excelentes fontes de antioxidantes naturais como a vitamina C, a vitamina E, carotenoides e as vitaminas do complexo B (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

As pimentas do gênero *Capsicum* são consumidas por um quarto da população mundial, principalmente como condimentos. Os maiores consumidores são os coreanos, tailandeses, indianos e mexicanos. Um especial destaque no mercado brasileiro é a pimenta dedo-de-moça (*C. baccatum* var. *pendulum*), sendo bastante consumida especialmente nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás. (CARVALHO *et al.*, 2009). O cultivo desse grupo varietal dedo-de-moça tem sido conduzido por pequenos produtores apresentando um típico perfil de agricultura familiar bem como em sistemas de integração pequeno agricultor – agroindústrias (CARVALHO *et al.*, 2009).

O mercado de sementes de hortaliças no Brasil é expressivo e altamente competitivo, com mais de 25 empresas atuando nas diversas espécies. No entanto, pouca atenção tem sido dada ao segmento de pimentas *C. baccatum* var. *pendulum* dedo-de-moça (CARVALHO *et al.*, 2009). A limitação da oferta de sementes de qualidade e de certo desinteresse por parte das empresas de sementes pelo desenvolvimento de novas cultivares de *C. baccatum* var. *pendulum* estão relacionados às deficiências nas técnicas de produção, baixo rendimento, dificuldade de extração das sementes e aos problemas relacionados com a qualidade fisiológica (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

As sementes constituem em um fator decisivo para o sucesso de plantios comerciais e, desse modo, deve-se atentar para a qualidade das mesmas. O estabelecimento de programas de controle de qualidade das sementes torna-se importante, em função do constante aumento das áreas cultivadas, dos custos de produção e do elevado grau tecnológico dos produtores. A exigência do mercado por sementes de qualidade leva as empresas de sementes a darem

ênfase e prioridade à produção de sementes com boas características físicas, fisiológicas, genéticas, e sanitárias, além de destinarem grandes investimentos para as pesquisas nessa área (NASCIMENTO, 2004). A utilização de sementes de qualidade comprovada traz vantagens econômicas, sociais e ambientais para os produtores e consumidores.

Processos fisiológicos relacionados com o desenvolvimento e a germinação de sementes determinam a qualidade das mesmas. A qualidade de um lote de sementes compreende características próprias que determinam seu valor. Os componentes relacionados com a qualidade das sementes apresentam importância equivalente. Porém os aspectos fisiológicos têm recebido maior atenção. A alta qualidade das sementes resulta em maior vigor, emergência, uniformidade e produtividade final, constituindo, portanto, fator básico para o sucesso da lavoura (FREITAS *et al.*, 2008). Em geral, para espécies cujas sementes estão contidas em frutos carnosos, como é o caso das pimentas da espécie *C. baccatum* var. *pendulum*, a máxima germinação e o máximo vigor ocorrem quando a semente atinge a maturidade fisiológica, ou seja, o máximo conteúdo de matéria seca (NASCIMENTO *et al.*, 2006). A partir da maturidade fisiológica iniciam-se, nas sementes, alterações degenerativas que comprometem a germinação e o vigor (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Os principais parâmetros utilizados na identificação em campo da maturidade fisiológica das sementes, bem como, o ponto ideal para a colheita, tem sido a idade e a coloração dos frutos. Essa alteração de coloração é um indicativo do ponto de maturidade fisiológica das sementes, onde são observados níveis máximos de germinação e vigor e mínimos de deterioração (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Assim, o reconhecimento prático da maturidade fisiológica é estratégico para a definição do momento ideal de colheita, contribuindo para a produção de sementes de alta qualidade fisiológica e sanitária.

Diante da demanda por pimentas do grupo varietal dedo-de-moça e, conseqüentemente, por sementes de qualidade, são necessários estudos mais aprofundados sobre os aspectos fisiológicos relacionados com o desenvolvimento, maturação e germinação das sementes de acessos de *C. baccatum* var. *pendulum*. Neste contexto, estudos relacionados à maturidade fisiológica e colheita das sementes são importantes, uma vez que estas alcançam sua qualidade fisiológica máxima no campo. Tais conhecimentos são imprescindíveis, principalmente, no que diz respeito ao planejamento e definição da época ideal de colheita para minimizar os efeitos da deterioração das sementes provocados pela permanência prolongada dos frutos no campo; por outro lado, a colheita precoce dos frutos poderá acarretar

grande proporção de sementes imaturas, reduzindo assim a produtividade e a qualidade das sementes (NASCIMENTO, 2004). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica de sementes de pimenta da espécie *C. baccatum* var. *pendulum* obtidas de frutos em diferentes estádios de maturação, por meio de estudos relacionados com a determinação da maturidade dos frutos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produção de sementes

O campo de produção de sementes foi instalado na área experimental da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF (latitude 15° 55' 45" S, longitude 48° 08' 33" e altitude média de 998 m), em 29 de março de 2012 e conduzido até 08 de novembro do mesmo ano (**Anexo 1**). As análises dos frutos e das sementes foram realizadas de novembro a dezembro de 2012 nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Pós-colheita.

Utilizou-se a cultivar de pimenta BRS Mari (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) do tipo varietal dedo-de-moça (CARVALHO *et al.*, 2009). Para a produção de mudas, as sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) com 128 células, contendo substrato comercial *Bioplant*<sup>®</sup>. O transplântio das mudas foi realizado aos 35 dias após semeadura. O solo foi preparado convencionalmente e as correções foram feitas de acordo com a análise química do mesmo.

No campo, as plantas foram dispostas em espaçamento de 1,2 m entre linhas x 0,8 m entre plantas. O cultivo das plantas seguiu as recomendações usuais para pimenta (FILGUEIRA, 2005; RIBEIRO *et al.*, 1999).

Os botões florais foram etiquetados no dia 15 de agosto, aproximadamente 105 dias após o transplântio das mudas. A colheita dos frutos foi realizada manualmente aos 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 dias após a antese (DAA). Foram colhidos, ao acaso, 50 frutos de cada tratamento. Logo após a colheita, antes da extração de sementes, foi determinado o comprimento e a coloração dos frutos. Para realização do teste de clorofila foi separado o pericarpo fresco e, para o teste de capsaicina, no momento da extração, foram separados as sementes, a placenta e o pericarpo.

Após a extração, as sementes foram submetidas à secagem em temperatura ambiente por 24 horas em estufa a 40°C por 24 horas, com a finalidade de atingir o grau de umidade compatível com o armazenamento, aproximadamente 6%. Em seguida foram acondicionadas

em embalagens impermeáveis e armazenadas em câmara fria a 15°C para posterior avaliações da qualidade fisiológica.

Foram realizados os seguintes testes e determinações nos frutos:

## 2.2 Colorimetria de frutos (sistema L\*a\*b\*)

A medida objetiva da coloração de pimentas foi realizada por meio de um sistema tri-axial (“tristimulus”) de cores, que fornece três coordenadas (L\*a\*b\*) permitindo ao observador determinar com exatidão a coloração do objeto em estudo (MATTOS, 2007). Neste sistema de representação de cor, os valores de L\*, a\* e b\* descrevem a uniformidade da cor no espaço tridimensional, em que o eixo x corresponde às cores que variam do verde (- a) ao vermelho (+ a); o eixo y corresponde às cores que variam do amarelo (- b) ao (+ b) azul e o eixo z corresponde às cores que variam do branco (+ L) ao preto (- L) (MORETTI, 2006; MINOLTA CORP, 1994). A avaliação da coloração foi feita em dois pontos da superfície do fruto na região equatorial (**Anexo 2**). O colorímetro foi encostado na superfície do fruto e, mantido firmemente em contato para proceder a leitura. Os valores de L\*,a\* e b\* foram anotados para posterior interpretação. As fórmulas utilizadas para interpretação foram ângulo Hue e Croma, de acordo com as seguintes equações:

$$1- \hat{\text{Ângulo Hue}} = \text{arcotang}(a,b) * 180/\pi$$

$$2- \text{Croma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

## 2.3 Teor de clorofila no pericarpo dos frutos

A determinação da clorofila total, a e b foi baseada na metodologia descrita por (INSKEEP e BLOOM, 1985 citada por MATTOS *et al.* 2007), com modificações realizadas no preparo da amostra. Pesou-se 5 g da região equatorial do pericarpo fresco e picado de cada tratamento com três repetições, em balança digital com precisão de 0,0001g. Em seguida foi

colocado num almofariz, e dentro da capela, foi adicionado 10 mL do solvente N,N-dimetilformamida (DMF); com o auxílio de um pistilo, promoveu-se a maceração do material até obtenção de um macerado uniforme (**Anexo 3**). Logo após, o material foi transferido para frascos onde foram adicionados mais 10 mL de DMF. Os frascos foram tampados e protegidos com papel alumínio, para evitar a fotodegradação dos pigmentos clorofílicos, e armazenados em câmara fria a  $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Decorrido o período, os frascos foram retirados da câmara fria e promovido a agitação por 24 h. O solvente foi filtrado em papel-filtro Whatmann nº 4 e, em seguida, com auxílio do espectrofotômetro portátil (Chroma Meter CR-400), procedeu-se a leitura da absorbância a 647 nm e 664,5 nm. Os valores foram anotados para posterior interpretação dos resultados. A concentração de pigmentos ( $\text{mg. Kg}^{-1}$ ) foi calculada de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Clorofila total} = 17,95 * A_{647} + 7,90 * A_{664,5}$$

$$\text{Clorofila b} = 20,47 * A_{647} - 4,73 * A_{664,5}$$

$$\text{Clorofila a} = 12,70. A_{664,5} - 2,79. A_{647}$$

## **2.4 Comprimento longitudinal dos frutos**

Foram utilizados 10 frutos de cada tratamento e o comprimento foi mensurado em centímetros, com auxílio de um paquímetro digital (**Anexo 4**). Cada fruto constituiu de uma repetição.

## **2.5 Teor de capsaicina nos diferentes estádios fisiológicos dos frutos**

A caracterização química foi realizada através do método AOAC Official Method 995.03 que pode ser utilizado para determinação do teor de capsaicinóides entre 750 e 650.000 Unidades de Calor Scoville (SHU) (PARRISH, 1996). Amostras de pericarpo, placenta e sementes dos frutos foram colocadas em estufa, com ventilação forçada de ar, para

secagem durante três dias à temperatura de aproximadamente 60°C. Decorrido o período, as amostras foram moídas. Foi quantificado o conteúdo de capsaicina de forma isolada para cada parte do fruto (**Anexo 5**).

### **2.5.1 Preparo do padrão**

**2.5.1.1 Solução estoque** - 150 mg de N-vanilila-n-nonamida foi colocada em um balão volumétrico de 100 mL e, em seguida foi dissolvido em álcool etílico grau cromatográfico e completado o volume do balão.

**2.5.1.2 Solução de trabalho** - Foi transferido 2 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com álcool etílico grau cromatográfico.

### **2.5.2 Preparo da amostra**

As amostras secas foram trituradas em moinho e pesadas em alíquota de 2 g/ tratamento e transferido para um balão volumétrico de 100 mL e adicionado 80 mL de etanol desnaturado. A solução foi agitada vigorosamente e colocada em banho maria a 70°C, com agitação, por 5 horas. Ao final deste período, os balões foram retirados do banho maria, resfriados até temperatura ambiente e o volume completado para 100 mL. O sobrenadante foi mantido em geladeira a 4°C, para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC).

### **2.5.3 Injeção da amostra**

As amostras foram filtradas através de uma membrana FG (fluoropore) em PTFE 0,45 µm de poro, hidrofóbica, com auxílio de uma seringa de 5 mL, coletando-se 2 mL do material filtrado e transferindo para frascos de vidro. Os frascos contendo as amostras foram colocados no compartimento de bandeja do cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). As condições do HPLC foram formadas por uma fase móvel composta por acetonitrila (40%) e água contendo 1% de ácido acético (60%), que atravessa uma fase estacionária formada pela coluna Luna C18(2), 150 x 4,6 mm, 5 µL (marca Phenomenex) a um fluxo de 1,5 mL por minuto, resultando em um tempo total de corrida de 30 minutos para cada amostra. A separação dos capsaicinóides foi feita pela injeção de 20 µL de extrato de cada amostra em triplicatas, que percorreram a fase estacionária juntamente com a fase móvel.

#### 2.5.4 Injeção do padrão

A solução de trabalho foi transferida para um frasco de vidro, previamente preparada e filtrada através de um filtro milipore 0,45 µm e injetada 20 µL da solução no HPLC. A separação dos capsaicinóides foi feita pela injeção de 20 µL de extrato, em uma coluna Luna C18(2), 150 x 4,6 mm, 5µL (marca Phenomenex) a um fluxo de 1,5 mL por minuto.

#### 2.5.5 Detecção de capsaicinóides

Os picos de capsaicinóides foram obtidos a partir de um detector do tipo fotodiodo (PDA-“photodiodearray detector”) UV-vis (ultravioleta – visível), utilizando-se como referência o comprimento de onda de 280 nm. A identificação dos capsaicinóides foi baseada na comparação do tempo de retenção dos picos relativos aos capsaicinóides encontrados em amostras de padrões comerciais de capsaicina e diidrocapsaicina. A quantificação dos capsaicinóides foi feita a partir da comparação da área do pico obtida da injeção do padrão de capsaicina na concentração de 0,015 mg/mL, com as áreas obtidas aos picos correspondentes aos capsaicinóides da injeção da amostra. Uma nova alíquota do padrão foi injetada a cada seis amostras analisadas. Os resultados foram expressos em SHU (‘Scoville Heat Units’) de nordiidrocapsaicina, capsaicina e diidrocapsaicina e capsaicinóides totais. As seguintes equações foram utilizadas para o cálculo:

$$SHU_N = (M_N/M_S)(C_S \times P_S/W_T) * (100/0,98) * (9300)$$

$$SHU_C = (M_C/M_S)(C_S \times P_S/W_T) * (100/0,89) * (16100)$$

$$SHU_D = (M_D/M_S)(C_S \times P_S/W_T) * (100/0,93) * (16100)$$

$$SHU_T = SHU_N + SHU_C + SHU_D$$

em que,

$SHU_N$ ,  $SHU_C$ ,  $SHU_D$ ,  $SHU_T$  = SHU dos capsaicinóides nordiidrocapsaicina, capsaicina, diidrocapsaicina e totais, respectivamente.

$M_N$ ,  $M_C$ ,  $M_D$ ,  $M_S$  = média das áreas dos picos de nordiidrocapsaicina, capsaicina, diidrocapsaicina e do padrão, respectivamente.

$C_S$  = concentração do padrão de capsaicina em mg/mL.

Ps - área do pico relativo ao padrão de capsaicina

Wt – peso da amostra teste

Foram realizados os seguintes testes e determinações nas sementes:

## **2.6 Teor de Água**

O teor de água das sementes foi avaliado em estufa a  $105 \pm 3$  °C durante 24 horas, utilizando-se duas sub-amostras para cada tratamento, conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem média por tratamento.

## **2.7 Massa de 100 sementes**

A massa média foi determinada com quatro repetições de 100 sementes que foram pesadas em balança digital com precisão de 0,001g, sendo os cálculos efetuados conforme recomendações das RAS (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em gramas (g).

## **2.8 Teste de Germinação**

Cada tratamento foi composto por quatro repetições de 50 sementes distribuídas sobre duas folhas de papel mata borrão, umedecidas com água na proporção de 2,5 vezes o peso do substrato seco, em caixas plásticas tipo “gerbox”. As caixas foram mantidas em germinadores sob regime alternado de temperatura e luz 20°C (durante 16 h, correspondente ao período noturno) e 30°C (durante 8 h, correspondente ao período diurno) (**Anexo 6**). As

avaliações foram feitas no décimo quarto e no vigésimo primeiro dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais, conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

## **2.9 Primeira contagem de germinação**

Conduzido simultaneamente ao teste de germinação, constituiu o registro da porcentagem de protrusão da raiz primária obtida no décimo quarto dias após o início do teste.

## **2.10 Emergência de plântulas em casa de vegetação**

As sementes foram distribuídas em bandejas multicelulares de poliestireno expandido (isopor) contendo 200 células preenchidas com substrato comercial (Bioplant). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação (**Anexo 7**). Cada tratamento foi composto por quatro repetições de 50 sementes. As avaliações foram realizadas no décimo quarto e vigésimo primeiro dias após a instalação do teste, computando-se a porcentagem de plântulas normais.

## **2.11 Teste de envelhecimento acelerado**

Foram utilizadas caixas plásticas tipo “gerbox”, funcionando como compartimento individual (mini-câmara), possuindo em seu interior uma bandeja com tela de alumínio, onde foram distribuídas em camadas uniformes de 200 sementes por tratamento em 4 repetições de 50 sementes, conforme metodologia recomendada pela “Association of Official Seed Analysts” (1987) e descrita por (MARCOS FILHO *et al.*, 1987). Dentro de cada compartimento individual, foram adicionados 45 mL de solução saturada de NaCl (40g de

NaCl/ 100 mL de água). As caixas contendo as sementes foram fechadas e mantidas em uma câmara de envelhecimento acelerado, regulada a temperatura constante de 41°C por 48 horas. Decorrido o período de envelhecimento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação conforme metodologia descrita anteriormente (**Anexo 8**). A avaliação foi realizada aos 21 dias após a instalação do teste. Os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais para cada tratamento (TORRES, 2005).

## **2.12 Delineamento experimental e análise estatística**

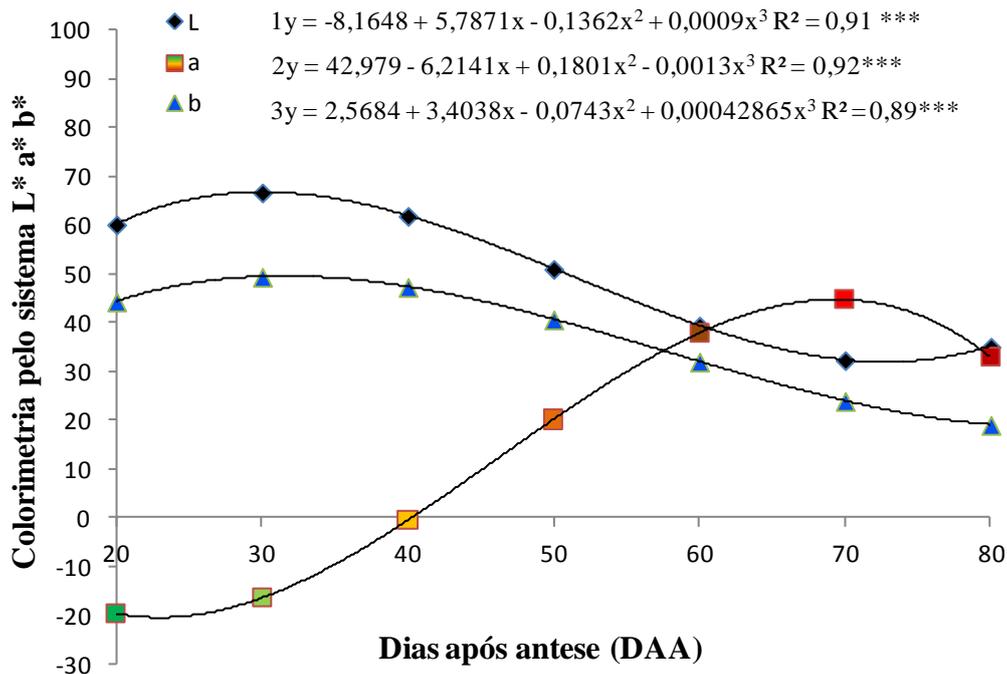
Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para a maioria das variáveis analisadas, exceto para a coloração e comprimento dos frutos, onde utilizou-se 10 repetições, e clorofila e capsaicina com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de regressão pelo procedimento PROC REG do programa computacional SAS (SAS 9.1.3, 2000-2004).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos no teste de coloração  $L^*a^*b^*$ , os teores referentes à luminosidade  $L^*$  para os frutos com 80 DAA apresentaram decréscimo de 51,3%, quando comparados com os valores de  $L^*$  para frutos de 20 DAA (**Figura 1**). Esses valores descrevem que o fruto imaturo possuía bastante brilho em relação aos frutos maduros. Em abóbora foram encontrados os valores para frutos imaturos de 76,86 de  $L^*$  e 75,34  $L^*$  para frutos maduros, não havendo muita variação entre a idade de maturação (MOLINA *et al.*, 2008). Os valores de  $a^*$  apresentaram aumento considerável durante todo o desenvolvimento, variando de -18,31 em frutos com 20 DAA até 37,75 em frutos com 80 DAA, indicando a mudança de coloração do verde brilhante para o vermelho opaco. O aumento no valor de  $a^*$  pode ser decorrente de mudanças em dois pigmentos: decréscimo na clorofila e aumento nas antocianinas (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Os valores de  $b^*$  em todas as etapas de maturação apresentaram valores decrescentes, ou seja, de 45,94 para 20,0 para os frutos colhidos aos 20 e 80 DAA, respectivamente.

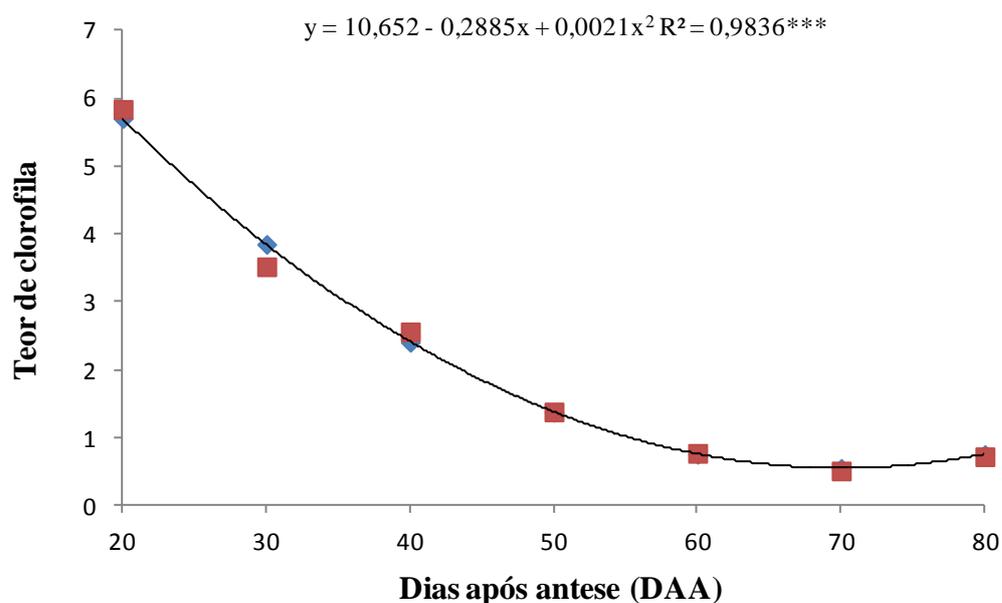
Os valores de  $L^*$  60,21 e  $a^*$  -18,31 encontrados aos 20 DAA, indicam maior preservação da cor verde devido uma maior concentração de clorofila.

A cor dos frutos das pimentas é bastante variada, começando geralmente com verde, amarelo ou branco no fruto não maduro, e se tornando vermelho, marrom ou quase preto em frutos maduros (LONG-SOLIS, 1998). A coloração dos frutos de pimenta em cada estágio de maturação depende da capacidade dos frutos de sintetizar carotenóides e até mesmo de reter pigmentos de clorofila.



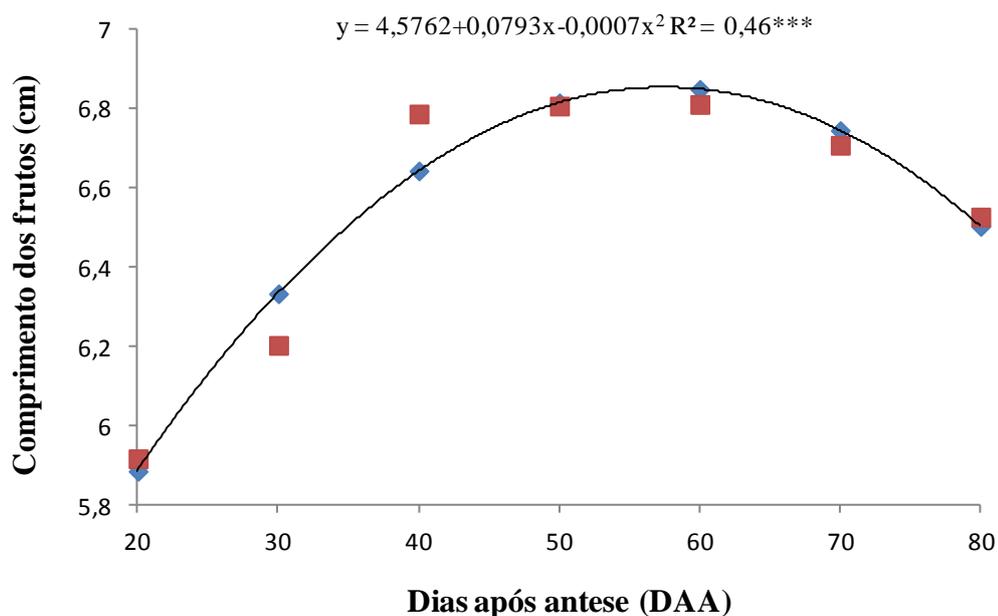
**Figura 1.** Colorimetria pelo sistema L\*a\*b\* em frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. L = branco (+L) ao preto (-L); a = verde (-a) ao vermelho (+a); b = amarelo (-b) ao azul (+b). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

Com relação ao teor de clorofila, foram observadas diferenças significativas em todos os estádios de maturação, sendo que, a partir de 60 DAA, o teor estabilizou (**Figura 2**). O estágio de maturação que apresentou o maior teor de clorofila foi aos 20 DAA. Isso se deve à imaturidade dos frutos, ainda com uma maior predominância de cloroplastos (HORNERO-MÉNDEZ e MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2002); a molécula de clorofila presente nos cloroplastos absorve a energia radiante e ativa o sistema fotossintético. A clorofila é o principal pigmento responsável pela coloração verde de frutas e hortaliças. Já a partir de 70 DAA o teor de clorofila foi mínimo, assim, um bom indicativo de processo avançado de amadurecimento (VIÑALS *et al.*, 1996).



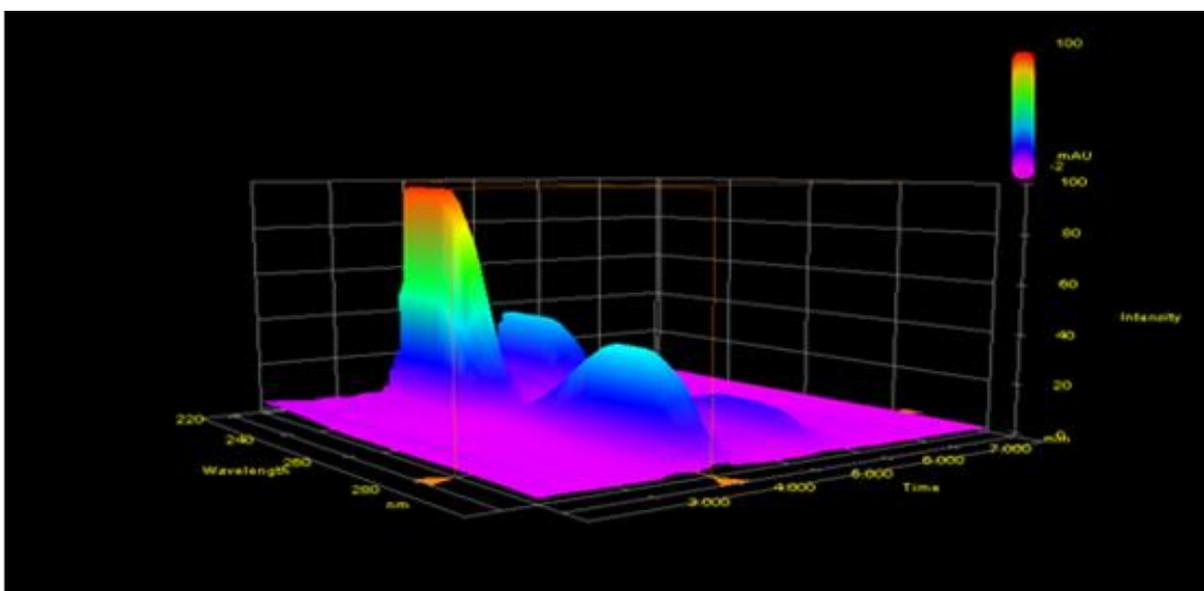
**Figura 2.** Teor de clorofila em frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Pontos (◆) e (■) representam dados estimados e observados, respectivamente. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

Os resultados obtidos em relação ao comprimento dos frutos apresentaram uma boa estratificação, demonstrando aumento gradativo até os 50 DAA. A partir desse momento, houve leve tendência à diminuir o comprimento dos mesmos conforme aumentava os estágios de maturação dos frutos (**Figura 3**). Isso pode ser atribuído ao fato de se tratar de uma espécie de crescimento indeterminado, onde o tamanho dos frutos tende a diminuir com o aumento da ordem de frutificação na planta (DIAS *et al.*, 2006a).

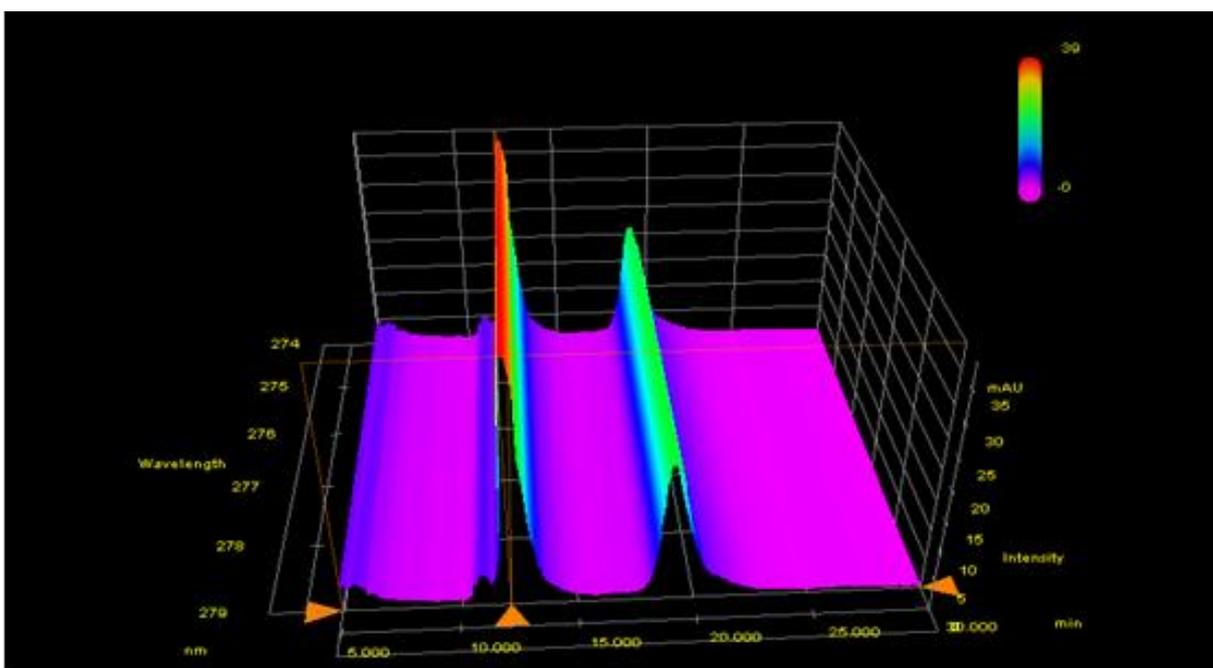


**Figura 3.** Comprimento longitudinal (cm) dos frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Pontos (◆) e (■) representam dados estimados e observados, respectivamente. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

Os picos de capsaicinóides encontrados no pericarpo, placenta e sementes foram obtidos utilizando-se como referência o comprimento de onda de 280 nm (**Figuras 4 e 5**).



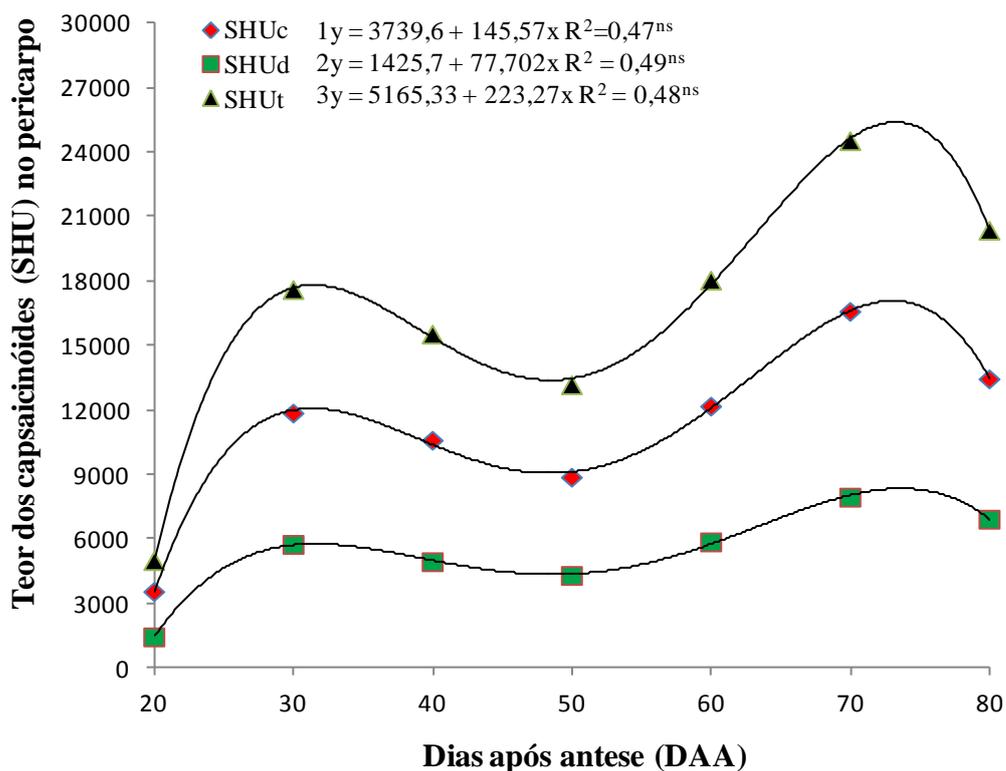
**Figura 4.** Visualização tridimensional dos picos dos diferentes capsaicinóides a 280 nm. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.



**Figura 5.** Visualização tridimensional dos picos de capsaicinóides obtidos na placenta dos frutos da cv. BRS Mari. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.

A análise de variância da regressão não demonstrou tendência significativa na variável pericarpo, indicando que não houve diferenças significativas desses capsaicinóides com o aumento do processo de maturação dos frutos. As concentrações dos capsaicinóides, capsaicina e diidrocapsaicina, encontrados no pericarpo apresentaram a mesma tendência. Os picos mais altos dos capsaicinóides foram observados aos 70 DAA. Apresentaram variação nos teores de capsaicina e diidrocapsaicina de 3.552,24 a 16.595,68 mg g<sup>-1</sup> e 1.443,14 a 7.947,45 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente (**Figura 6**). O teor de capsaicina total, soma dos dois capsaicinóides, variou de 4.995 a 24.543 mg g<sup>-1</sup>. A nordiidrocapsaicina não foi detectada no pericarpo do fruto em nenhum estágio de maturação.

Avaliando a relação da cor do fruto com a pungência, foi sugerido que o teor dos capsaicinóides poderia estar associado à cor do fruto, pois teores mais altos de pungência foram verificados em cultivares de cor laranja (PINO *et al.*, 2007). Em outra pesquisa foi encontrada maior pungência em frutos de cor amarela, embora o propósito do experimento não foi estudar a relação entre teor de capsaicina e cor de fruto (NWOKEM *et al.*, 2010). Quanto maior o grau de maturação da pimenta, maior será o conteúdo de capsaicina, dessa forma o conteúdo de capsaicina nos frutos pode estar relacionado com a cor dos frutos e conseqüentemente com o grau de maturação (LONG-SOLIS, 1998).



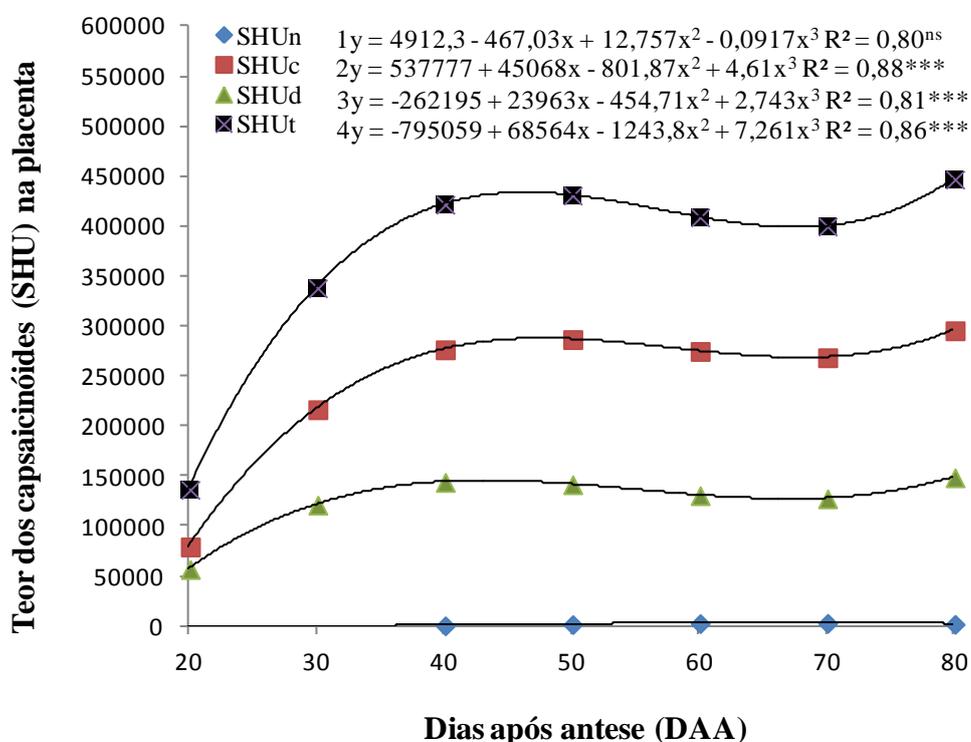
**Figura 6.** Teor dos capsaicinóides (SHU) no pericarpo dos frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. SHUc = capsaicina; SHUd = diidrocapsaicina; SHUt = total. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013. ns = não significativo ( $\alpha > 0,05$ )

Na placenta, local dos frutos onde a concentração de capsaicina é maior, foram detectados os picos mais altos de capsaicina ( $296.015,5 \text{ mg g}^{-1}$ ), e em menores quantidades de diidrocapsaicina ( $148.932,8 \text{ mg g}^{-1}$ ) e nordiidrocapsaicina ( $3.288,93 \text{ mg g}^{-1}$ ). A pungência total não apresentou diferenças após 40 DAA, assim, a média foi ajustada pela regressão cúbica em  $422.044,6 \text{ mg g}^{-1}$  (**Figura 7**).

Entre os princípios pungentes, 90% deles estão localizados na placenta dos frutos. Já as sementes não são fontes da pungência, mas ocasionalmente podem absorver capsaicina devido à proximidade da placenta. O valor SHU pode variar de zero (pimentões e pimentas doces) a mais de 300 mil (pimentas muito picantes) conforme a espécie. Esse valor pode ser alterado em função de vários fatores, tais como temperatura, adubação e irrigação (RIBEIRO e REIFSCHNEIDER, 2008). A placenta do fruto concentra o maior conteúdo de capsaicina, ou seja, cerca de 2,5% da matéria seca, enquanto que, nas sementes e no pericarpo, é de 0,07% e 0,03%, respectivamente. Em muitos casos, a quantidade de capsaicina no tegumento não atinge 10 partes por milhão (ppm), limite mínimo para a detecção de ardor pelas papilas gustativas humanas (NUEZ *et al*, 1996). A quantidade de

capsaicinóides acumulada nos frutos de pimenta é influenciada pelas condições ambientais, manejo da cultura e idade do fruto (BOSLAND, 1993).

No presente estudo, os teores de capsaicina detectados nas diferentes partes do fruto, estão acima daqueles resultados encontrados por outros autores, que obtiveram, dentre 63 acessos de *C. chinense*, variação na concentração de capsaicina de 0,01 a 1,52 mg g<sup>-1</sup> de fruto fresco (ANTONIOUS *et al.*, 2009). Entretanto, os valores de capsaicina encontrados nessa pesquisa não podem ser comparados com a maioria dos outros trabalhos, uma vez que a quantificação foi realizada em partes separadas do fruto, e não em todo o fruto como de rotina. A elevada pungência de 'BRS Mari', confirmada pelo alto conteúdo de capsaicina obtido, em especial na placenta, foi um resultado altamente significativo e promissor, especialmente para a indústria farmacêutica, que já utiliza a capsaicina como princípio ativo para a produção de diversos fármacos, como para as agroindústrias no processamento de molhos líquidos ou desidratados em flocos com as sementes observados na 'pimenta calabresa'.

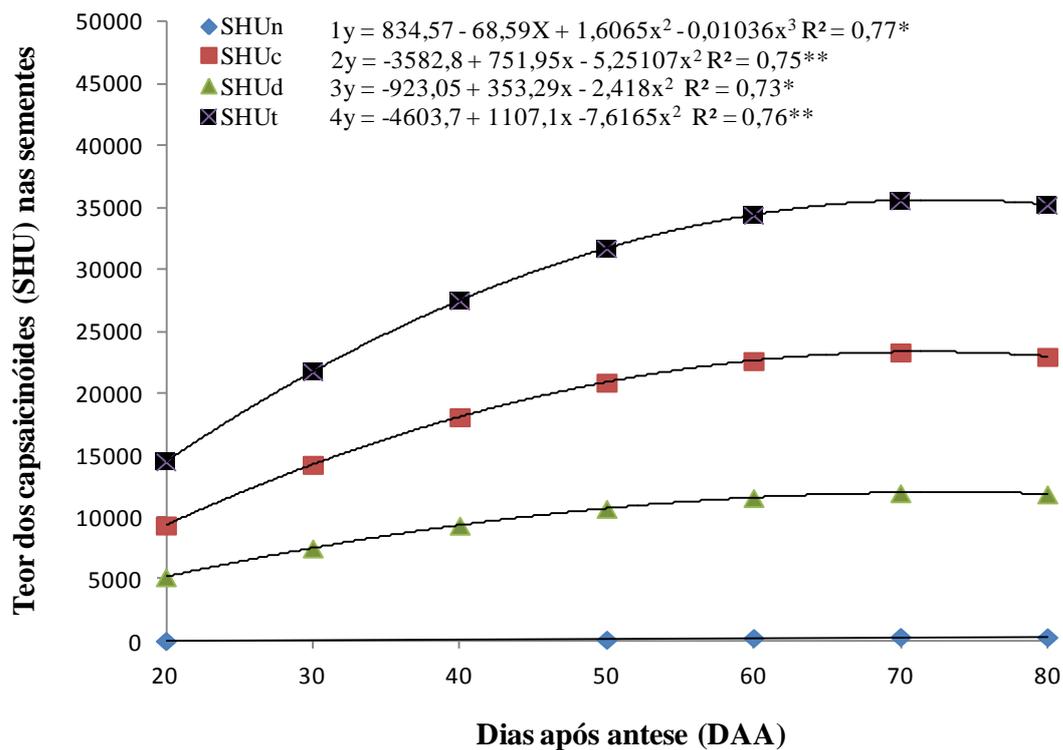


**Figura 7.** Teor dos capsaicinóides (SHU) na placenta dos frutos de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. SHUn = nordihidrocapsaicina; SHUc = capsaicina; SHUd = diidrocapsaicina; SHUt = total. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013. ns = não significativo ( $\alpha > 0,05$ ); \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

Nas sementes, o conteúdo da nordiidrocapsaicina somente foi detectado a partir de 50 DAA, porém com concentrações muito baixas, isto é, 266,97 mg g<sup>-1</sup>, em média. Com relação aos teores de capsaicina, a tendência foi crescente conforme o processo de maturação dos frutos; no entanto, aos 80 DAA, apresentou leve declínio. O pico máximo de 23.323,6 mg g<sup>-1</sup>, pela regressão quadrática, foi observado aos 70 DAA. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de diidrocapsaicina, exceto aos 20 DAA, que apresentou valor mínimo de 5.175,51 mg g<sup>-1</sup>. Para a pungência total, foi observada tendência crescente até os 70 DAA e, aos 80 DAA, apresentou um leve decréscimo (**Figura 8**). O estágio de desenvolvimento dos frutos interfere no conteúdo de capsaicinóides, observando-se acúmulo até o início do amadurecimento e decréscimo a partir desse estágio (BOSLAND e VOTAVA, 1999).

Os resultados da nordiidrocapsaicina, capsaicina, diidrocapsaicina e teor total, obtidos entre as variáveis pericarpo, placenta e sementes, apresentaram diferenças altamente significativas. Os picos mais altos foram observados na placenta (447.252,0 mg g<sup>-1</sup>), seguidos das sementes (35.572,23 mg g<sup>-1</sup>) e finalmente do pericarpo (23.026,08 mg g<sup>-1</sup>).

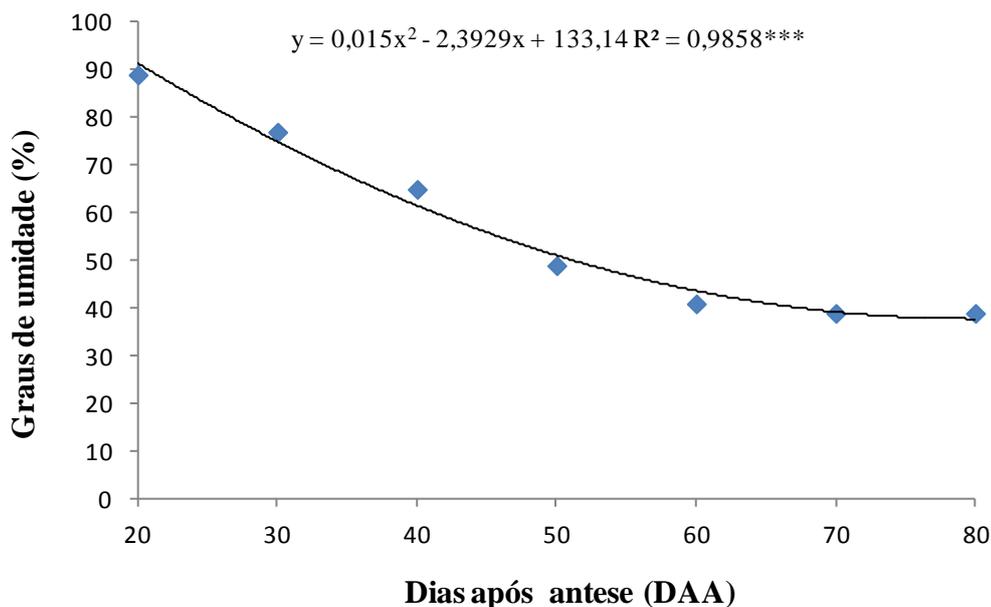
A diversidade de valores encontrados para os capsaicinóides é esclarecida por alguns autores como uma resposta influenciada pela interação genótipo-ambiente, algumas vezes com predomínio dos fatores ambientais e manejo da cultura. A mesma cultivar de pimenta plantada em diferentes locais apresenta diferentes teores de capsaicinóides, pois qualquer estresse à planta pode alterar a pungência do fruto (BOSLAND e VOTAVA, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2008; BORGES-GOMÉZ *et al.*, 2010).



**Figura 8.** Teor dos capsaicinóides (SHU) nas sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. SHUn = nordiidrocapsaicina; SHUc = capsaicina; SHUd = diidrocapsaicina; SHUt = total. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013. \* significativo a 5% ( $\alpha \leq 0,05$ ); \*\* significativo a 1% ( $\alpha \leq 0,01$ )

Segundo a regressão quadrática, o grau de umidade das sementes decresceu com o avanço do processo de maturação, sendo que, aos 20 DAA os frutos se encontravam totalmente imaturos com o teor de água de 89%. A partir daí, os teores de água apresentaram tendência decrescente até os 70 DAA, quando as sementes apresentaram teor de água mínimo, ou seja, 39%, momento em que a semente pode ter atingido a maturidade fisiológica; a partir deste ponto, observou-se uma estabilização (**Figura 9**). Embora tenha ocorrido uma redução gradativa do teor de água das sementes ao longo do seu desenvolvimento, o valor encontrado ao final do processo pode ser considerado relativamente alto (39%), o que também foi descrito por outros autores para sementes de frutos carnosos (DEMIR e ELLIS, 1992a,b; BEWLEY e BLACK, 1994; DEMIR *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2006a,b; VIDIGAL *et al.*, 2006). Em espécies de frutos carnosos como é o caso da pimenta, ocorre um equilíbrio osmótico entre o pericarpo do fruto, rico em solutos, e as sementes, resultando na estabilização do teor de água destas ao final da maturação (WELBAUM e BRADFORD, 1988).

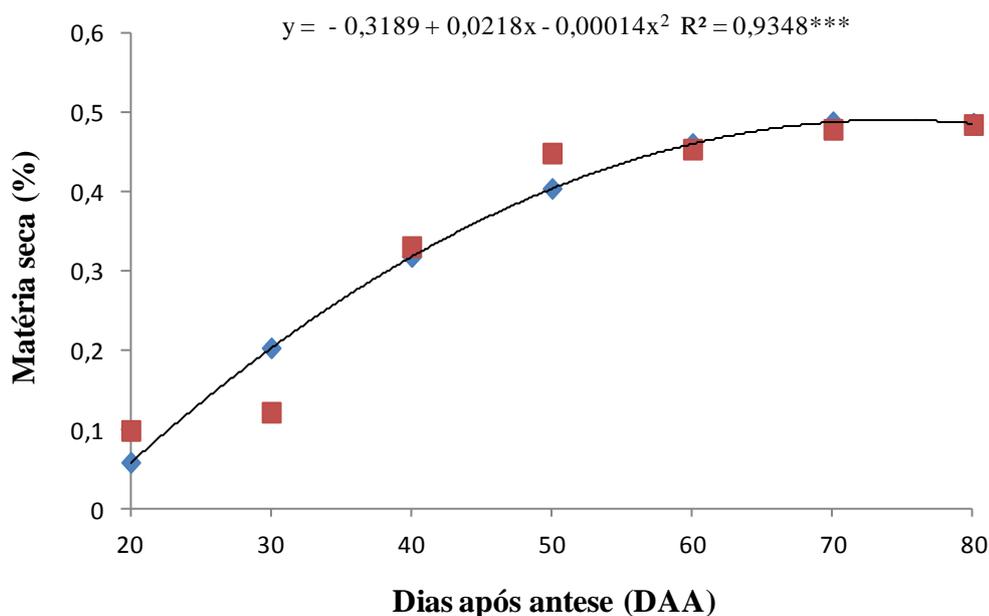
Embora seja utilizado por alguns autores, o teor de água das sementes não é um indicador adequado de maturidade fisiológica, por sofrer influências ambientais e genéticas. Por ocasião da maturação, foram observados valores diferentes para o teor de água das sementes de tomate, em dois anos agrícolas estudados, constatando valores de 53% e 72%, respectivamente, em 1989 e 1990 (DEMIR e ELLIS, 1992a). Resultados semelhantes foram obtidos em sementes de outra solanácea, como berinjela (DEMIR *et al.*, 2002).



**Figura 9.** Graus de umidade (%) de sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

O conteúdo de matéria seca, avaliado através da massa de 100 sementes, apresentou um rápido e constante aumento conforme o aumento dos estádios de maturação dos frutos, e decresceu a partir de 60 DAA (**Figura 10**). Esse comportamento indica que pode ter cessado a translocação de assimilados, ou seja, rompimento da conexão vascular da planta mãe para a semente. Essa característica têm sido apontada por diversos autores como um indicativo do ponto de maturidade fisiológica, partindo-se do princípio de que a semente está madura quando nada mais recebe da planta mãe (TEKRONY *et al.*, 1980; DEMIR e ELLIS, 1992a; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

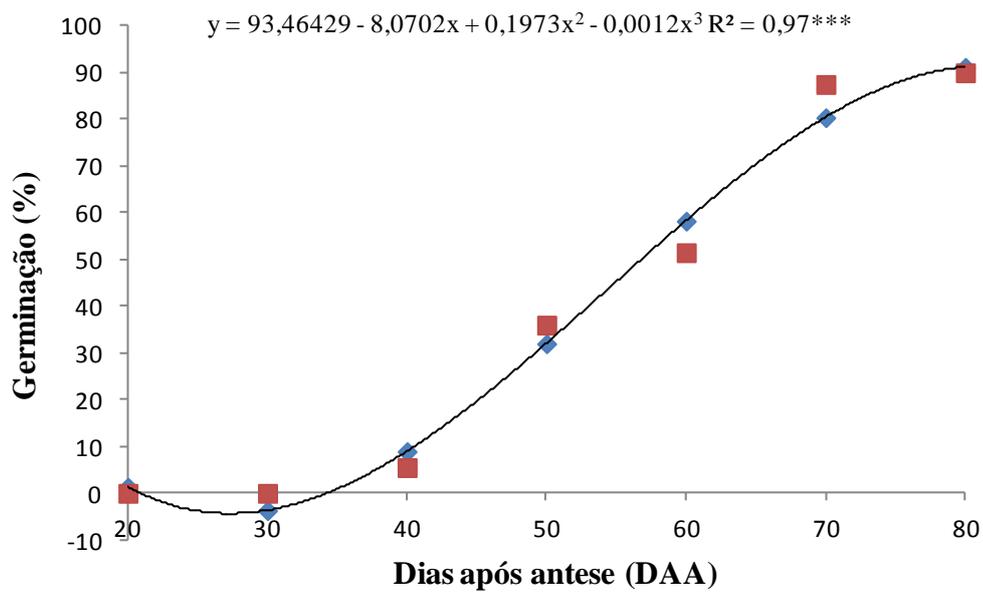
Em sementes de pimentão, o máximo acúmulo de matéria seca foi alcançado antes da qualidade máxima da semente. Deve-se, entretanto, alertar que o ponto de maturidade fisiológica, dentro de cada espécie, pode variar em relação ao momento de sua ocorrência, em função da cultivar e das condições ambientais (OLIVEIRA *et al.*, 1999).



**Figura 10.** Massa de 100 sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Pontos (◆) e (■) representam dados estimados e observados, respectivamente. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

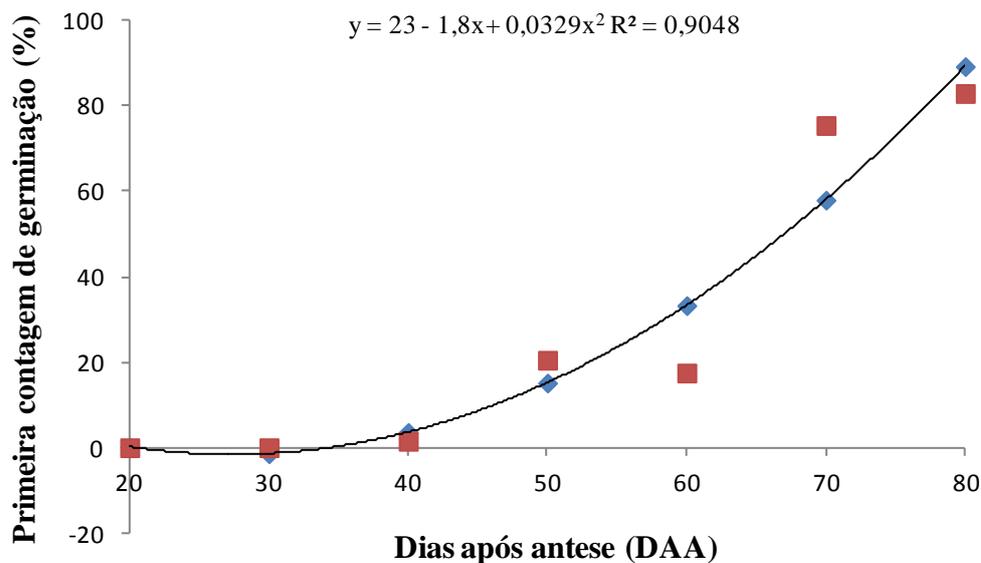
Foi observada uma tendência gradativa de aumento da germinação nos diferentes estágios de maturação. Notadamente, os valores máximos de germinação ocorreram aos 70 e 80 DAA. Aos 70 DAA, a germinação estava acima de 80%, coincidindo com o valor máximo de matéria seca (0,478 g). Vale ressaltar que nos dois primeiros estágios de maturação, a germinação foi nula (**Figura 11**).

Estudos relacionados com maturidade fisiológica de sementes têm apresentado resultados contraditórios quanto à ocorrência da qualidade máxima da semente durante o desenvolvimento. Em sementes de pimentão (*C. annuum* L.), foi verificado que o ponto de maturidade fisiológica ocorreu a partir dos 55 dias após a antese, período esse em que foram observados também valores máximos de vigor, massa seca e germinação das sementes (GONÇALVES, 1997). A qualidade máxima das sementes de tomate ocorreu mais de 20 dias após a massa máxima da matéria seca (DEMIR e ELLIS, 1992a). Resultados semelhantes foram verificados em outras solanáceas, como por exemplo em sementes de berinjela (DEMIR *et al.*, 2002) e de pimentão (OLIVEIRA *et al.*, 1999; DEMIR e ELLIS, 1992b). Por outro lado, porcentagens mais altas de germinação de sementes de tomate foram obtidas antes do máximo acúmulo de matéria seca (DIAS *et al.*, 2006a).



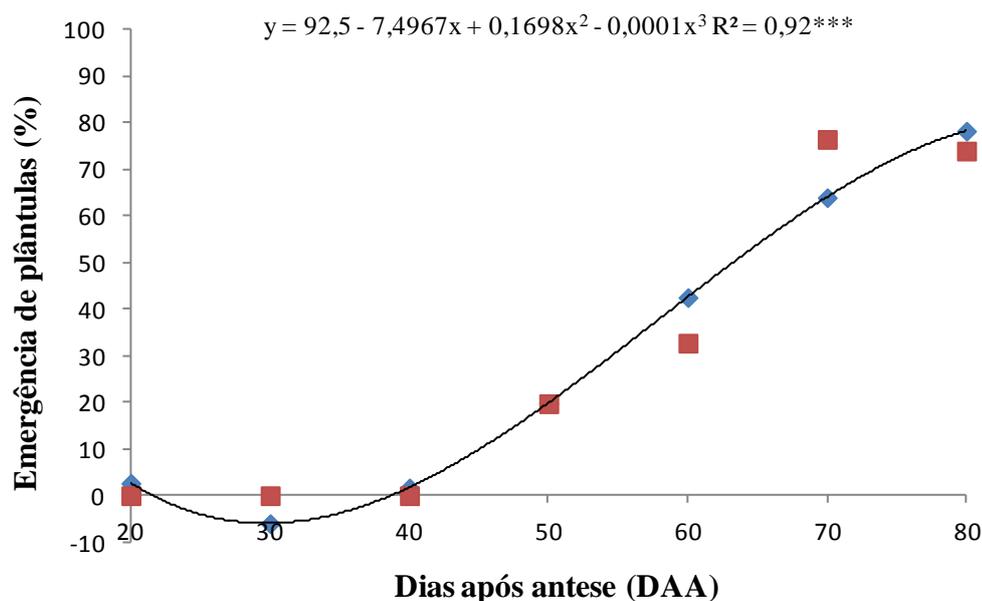
**Figura 11.** Germinação (%) de sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Pontos (◆) e (■) representam dados estimados e observados, respectivamente. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

Nas fases mais avançadas de maturação, ou seja, aos 70 e 80 DAA, foram obtidos o vigor máximo (**Figura 12**). Baixas porcentagens de germinação e vigor de sementes oriundas de frutos colhidos verdes aos 20 DAA e em estádios iniciais de maturação como aos 30, 40 e 50 DAA se deve à imaturidade fisiológica das sementes. Adiciona-se a isso a possibilidade de ocorrência de dormência das sementes nesses estádios iniciais, o que afeta diretamente seu real potencial de germinação e vigor.



**Figura 12.** Primeira contagem de germinação (%) em sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Pontos ( ◆ ) e ( ■ ) representam dados estimados e observados, respectivamente. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

Os resultados obtidos na emergência das plântulas em casa de vegetação apresentaram tendência crescente, sendo que os valores máximos de emergência foram obtidos em estádios mais avançados de maturação, ou seja, aos 70 e 80 DAA. Por outro lado, piores desempenhos foram observados em frutos verdes e em frutos oriundos de estádios iniciais de maturação (**Figura 13**). Este teste realizado em casa de vegetação ou em campo, constitui parâmetro indicador da eficiência dos testes de vigor para avaliação do potencial fisiológico dos lotes de sementes (MARCOS FILHO, 1999). O poder de discriminação deste teste foi decisivo, pois os estádios de maturação apresentaram diferenças altamente significativas entre si, permitindo a classificação dos estádios em diferentes níveis de vigor.

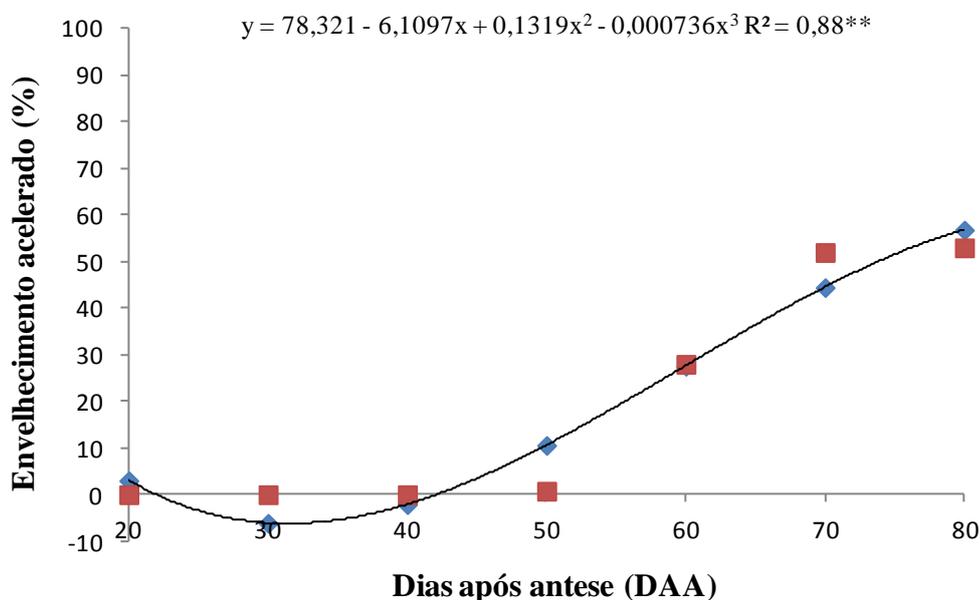


**Figura 13.** Emergência de plântulas (%) em sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Pontos (◆) e (■) representam dados estimados e observados, respectivamente. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\*\* significativo a 0,1% ( $\alpha \leq 0,001$ )

Por meio do teste de envelhecimento acelerado foi possível classificar os estádios de maturação em diferentes níveis de vigor. O vigor máximo foi obtido aos 70 e 80 DAA coincidindo com a emergência em casa de vegetação e a germinação (**Figura 14**). O teste de envelhecimento acelerado tem como base o fato de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente pela sua exposição à temperatura e umidade relativa elevadas, sendo estes os fatores ambientais mais relacionados à deterioração das sementes (MARCOS FILHO, 1999). O teste com o uso de solução saturada de NaCl, demonstrou-se eficiente para detectar níveis de qualidade fisiológica em sementes de pimenta-malagueta, *C. frutescens* L. (TORRES, 2005).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, a máxima qualidade fisiológica (germinação e vigor) das sementes de pimenta ‘BRS Mari’ ocorreu em frutos com idade entre 70 e 80 DAA, coincidindo com o máximo acúmulo de matéria seca. De um modo geral, o vigor das sementes aumentou gradativamente ao longo do processo de maturação. A mesma tendência foi proposta por outros autores, em que a qualidade máxima das sementes de diferentes espécies foi atingida no momento de máximo acúmulo de matéria seca (HARRINGTON, 1972; WELBAUM e BRADFORD, 1988; DEMIR *et al.*, 2004).

Por ser uma espécie de crescimento indeterminado, com florescimento contínuo, apresentando frutos em diferentes estádios de maturação, há certa dificuldade em nível de campo na determinação da melhor época para a colheita dos frutos, visando assim a obtenção de um bom rendimento de sementes e alta qualidade fisiológica. Como os frutos das diferentes espécies de pimenta são carnosos, o processo de maturação das sementes continua mesmo após a colheita dos frutos. Assim, o emprego adequado de técnicas de repouso ou armazenamento pós-colheita dos frutos, antes da extração das sementes, permite que as sementes ainda não totalmente maduras, completem sua maturação dentro dos frutos, enquanto as já maduras terão sua qualidade preservada por se manterem em equilíbrio osmótico dentro do fruto, ou seja, com alto grau de umidade (BARBEDO *et al.*, 1994).



**Figura 14.** Envelhecimento acelerado (%) em sementes de pimenta cv. BRS Mari em função do estágio de maturação dos frutos. Pontos (◆) e (■) representam dados estimados e observados, respectivamente. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2012. \*\* significativo a 1% ( $\alpha \leq 0,01$ )

#### 4 CONCLUSÕES

A maturidade fisiológica de sementes de pimenta *C. baccatum* var. *pendulum* ‘BRS Mari’ ocorreu a partir de 70 dias após a antese. E neste estágio, foram observados valores máximos de germinação, vigor e matéria seca das sementes. Notadamente, foram observados neste estágio os picos mais altos de capsaicina, coincidindo com o momento em que os frutos estavam com a coloração vermelha e apresentavam teores mínimos de clorofila.

Visando à melhoria da qualidade fisiológica das sementes de pimenta, e diante destes resultados, a colheita neste estágio de maturação pode reduzir a possibilidade da ocorrência de perdas, tanto quantitativas quanto qualitativas. Por outro lado, a permanência dos frutos no campo sujeitos às condições climáticas desfavoráveis e ao ataque de patógenos, propicia danos físicos, fisiológicos e gera, conseqüentemente, sementes de qualidade mais baixa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIOUS, G. F.; BERKE, T.; JARRET, R. L. Pungency in *Capsicum chinense*: variation among countries of origin. **Journal of Environmental Science and Health**, v.44, p.179-184, 2009.

BARBEDO, A. S. C.; ZANIN, A. C. W.; BARBEDO, C. J.; NAKAGAWA, J. Efeitos da idade e do período de repouso pós-colheita dos frutos sobre a qualidade de sementes de berinjela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.12, n.1, p.14-18, 1994.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1994, 420p.

BORGES-GOMEZ, L.; CÁRDENAS, L. C.; NOVELO, J. R.; FREGOSO, M. S.; OREGEL, V. R.; COUOH, E. V. Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. **Terra Latino Americana**, v.28, p.35-41, 2010.

BOSLAND, P. W. Chiles: A diverse Crop. **HortTechnology**, v.2, n.1, p.7-10, 1992.  
\_\_\_\_\_ Breeding for quality *Capsicum*. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v.12, p.25-31, 1993.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and spice Capsicums**. New York: CABI Publishing, p.66-83, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009, 395p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: Funep, 2000.

CARVALHO, S. I. C.; RIBEIRO, C. S. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. 'BRS Mari': Nova cultivar de pimenta dedo-de-moça para processamento. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.4, p.571-573, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005, 785p.

DEMIR, I.; ELLIS, R. H. Changes in seed quality during seed development and maturation in tomato. **Seed Science Research**, Wallingford, v.2, p.81-87, 1992a.

DEMIR, I.; ELLIS, R. H. Development of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v.121, n.2, p.385-399, 1992b.

DEMIR, I.; MAVI, K.; OZCOBAN, M. Changes in germination and potential longevity of watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds during development. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v.32, p.139-145, 2004.

DEMIR, I.; MAVI, K.; SERMENLI, T.; OZCOBAN, M. Seed development and maturation in Aubergine (*Solanum melongena* L.) **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v.67, n.4, p.148-154, 2002.

DIAS, D. C. F. S.; RIBEIRO, F. P.; DIAS, L. A. S.; SILVA, D. J. H.; VIDIGAL, D. S. Maturação de sementes de tomate em função da ordem de frutificação na planta. **Revista Ceres**, Viçosa, v.53, n.308, p.446-456, 2006a.

DIAS, D. C. F. S.; RIBEIRO, F. P.; DIAS, L. A. S.; SILVA, D. J. H.; VIDIGAL, D. S. Tomato seed quality in relation to fruit maturation and post-harvest storage. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 34, n.3, p.691-699, 2006b.

EMBRAPA. **Pimentas e pimentões: preservação da biodiversidade gera riquezas...** In: Hortinforme: Informativo Externo da Embrapa Hortaliças, n.11, p.4-5, 2002.

FILGUEIRA, F. A. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2 ed. Viçosa : UFV, 2005, 412p.

FREITAS, R. A. de.; NASCIMENTO, W. M.; CARVALHO, S. I. C. de. Produção de sementes. In: Ribeiro, C. S. C.; Lopes, C. A.; Carvalho, S. I. C.; Henz, G. P.; Reifschneider, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.173-187, 2008.

GONÇALVES, C. P. **Desenvolvimento e maturação fisiológica da semente de pimentão cv. All Big**. Areia: Universidade Federal da Paraíba, 1997. Dissertação de mestrado.

HARRINGTON, J. F. Seed storage longevity. In: KOZLOWSKY, T.T. (Ed.) **Seed biology**. New York: Academic Press, v.3, p.145-245, 1972.

HORNERO-MÉNDEZ, D.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Chlorophyll disappearance and chlorophyllase activity during ripening of *Capsicum annum* L. fruits. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.82, p.1564-1570, 2002.

LINGUANOTTO, NETO N., **Dicionário gastronômico: pimentas com suas receitas**. São Paulo: Boccato editores, p.32-67, 2004.

LONG-SOLIS. ***Capsicum* y cultura: la historia del chilli**. México: Ed. Fondo de Cultura Económica, p.240, 1998.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987, 230p.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, cap.1 e 3, p.1-24, 1999.

MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; HENZ, G. P. **Protocolos de avaliação da qualidade química e física de pimentas (*Capsicum* sp.)**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. (Comunicado Técnico, n.50).

MINOLTA CORP. **Precise color communication: color control from feeling to instrumentation.** Ramsey: Minolta Corporation Instrument Systems Division, 1994, 49p.

MOLINA, J. F. A.; PALMA, G. B. A.; ACOSTA, V.; ACUÑA, O. **Caracterización físico-química del zambo (*Cucurbita ficifolia* B.) y elaboración de dos productos a partir de La pulpa.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ingenieras Agroindustriales) – Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito, Ecuador, 2008, 164p.

MORETTI, C. L. **Protocolos de Avaliação da Qualidade Química e Física de Tomate.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. (Comunicado Técnico, n.32).

NASCIMENTO, W. M.; DIAS, D. C. F. S.; FREITAS, R. A. Produção de sementes de pimentas: cultivo da pimenta. **Informe agropecuário,** Belo Horizonte, v.27, n.235, 2006.

NASCIMENTO, W. M. Mercado de sementes de pimentas no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DO AGRONEGÓCIO PIMENTAS (*Capsicum* sp.), **Anais...** Brasília: Embrapa Hortaliças, 1, 2004. (CD-ROM).

NWOKEM, C. O.; AGBAJI, E. B.; KAGBU, J. A.; EKANEM, E. J. Determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. **New York Science Journal,** v.3, p.17-21, 2010.

NUEZ, V. F.; ORTEGA, G. R.; COSTA, G. J. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies.** Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1996, 607p.

OLIVEIRA, A. P.; GONÇALVES, C. P.; BRUNO, R. L. A.; ALVES, E. U. Maturação fisiológica de sementes de pimentão, em função de idade de frutos após a antese. **Revista Brasileira de Sementes,** Brasília, v.21, n.2, p.88-94, 1999.

PARRISH, M. Liquid chromatographic method for determining capsaicinoids in capsicums and their extractives: collaborative study. **Journal of AOAC International,** v.79, n.3, p.738-745, 1996.

PINO, J.; GONZÁLEZ, M.; CEBALLOS, L.; CENTURIÓN-YAH, A. R.; TRUJILLO-AGUIRRE, J.; LATOURNERIE-MORENO, L.; SAURI-DUCH, E. Characterization of total capsaicinoids, color and volatile compounds of habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars in Yucatan. **Food Chemistry**, v.104, p.1682-1686, 2007.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5ª aproximação**. Viçosa: CFSEMG, 1999, 359p.

RIBEIRO, C. S. da C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Genética e melhoramento. In: Ribeiro, C. S. C.; Lopes, C. A.; Carvalho, S. I. C; Henz, G. P.; Reifschneider, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.55-70, 2008.

SAS Institute Inc., SAS 9.1.3 Help and Documentation, Cary, NC: **SAS Institute Inc.**, 2000-2004.

TEKRONY, D. M.; EGLY, D. B.; PHILLIPS, A. D. Effects of field weathering on the viability and on vigor of soybean seed. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, n.5, p.749-753, 1980.

TORRES, S. B. Envelhecimento acelerado em sementes de pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens* L.). **Revista Ciência Agrônômica**, vol.36, n.1, p.98-104, 2005.

VIDIGAL, D. S.; DIAS, D. C. F. S.; NAVEIRA, D. S. P.; ROCHA, F. B.; BHERING, M. C. Qualidade fisiológica de sementes de tomate em função da idade e do armazenamento pós-colheita dos frutos. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.3, p.87-93, 2006.

VIÑALS, F. N.; ORTEGA, R. G.; GARCIA, J. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madrid: Ediciones mundi-prensa, 1996.

WELBAUM, G. E; BRADFORD, K. J. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). I. Water relations of seeds and fruit development. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, p.406-411, 1988.

# CAPÍTULO 2

---

---

**Determinação da taxa de cruzamento natural e monitoramento da pureza genética de sementes de *Capsicum annuum* utilizando marcadores codominantes associados com a pungência dos frutos**

## **Determinação da taxa de cruzamento natural e monitoramento da pureza genética de sementes de *Capsicum annuum* utilizando marcadores codominantes associados com a pungência dos frutos**

### **RESUMO**

Ferramentas moleculares têm sido empregadas em sistemas de produção de sementes para monitorar a qualidade genética de cultivares e híbridos de diferentes espécies de hortaliças. Em *Capsicum*, um marcador molecular codominante específico para um gene associado com acumulação do alcaloide capsaicina (pungência) no tecido placentário dos frutos (gene *Pun-1*) apresenta diversas características de interesse para utilização em sistemas de diagnóstico precoce da pureza genética bem como em estudos visando determinar os níveis de polinização cruzada entre diferentes acessos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade genética das sementes de *C. annuum* obtidas em sistemas de produção estabelecidos em condições de campo no Planalto Central do Brasil. O experimento foi realizado na área experimental e laboratório de melhoramento genético vegetal da Embrapa Hortaliças em Brasília-DF. Para a determinação da taxa de cruzamento natural e o efeito do isolamento espacial na pureza genética foram utilizadas plantas da cultivar de pimenta *C. annuum* cv. ‘BRS Garça’ (frutos picantes) como genitor masculino e o híbrido de pimentão *C. annuum* ‘Magali R’ (frutos doces) como genitor feminino. As parcelas foram compostas de 14 linhas de 20 m de comprimento, espaçadas a 1,2 m entre linhas, com 20 plantas em cada. Nas duas fileiras centrais foram transplantadas 40 plantas do acesso doador de pólen. Para análise da taxa de fecundação cruzada, utilizou-se o primeiro fruto maduro do genitor feminino de cada planta. Após isso, as sementes foram extraídas, secadas e embaladas. Uma amostra dessas sementes foi semeada em casa de vegetação e as folhas jovens das mudas foram coletadas para extração de DNA. A análise molecular foi realizada mediante o emprego da técnica de PCR com o marcador codominante derivado de primers capazes de anelar em um segmento do gene codificando uma acil-transferase (gene *Pun-1*). O delineamento utilizado foi blocos ao acaso, com seis tratamentos e duas repetições, totalizando 12 parcelas que se constituíram de linhas com 20 plantas perfazendo o total de 240 plantas. O marcador molecular mostrou-se eficiente para quantificar as taxas de cruzamento natural em condições de campo. A taxa de cruzamento natural nas plantas e sementes foi de 10,8% e 1,2% respectivamente. Estes

resultados demonstram a utilidade desse marcador molecular na identificação da pureza genética das sementes durante a manutenção, multiplicação de germoplasma e a produção de sementes comerciais de pimenta.

**Palavras-chave:** *Capsicum*, marcadores moleculares, PCR, taxa de cruzamento natural, polinização.

**Determination of natural rates of cross-pollination and monitoring genetic purity of *Capsicum annuum* seeds using codominant markers associated with the fruit pungency**

**ABSTRACT**

Molecular tools have been used in seed production systems to monitor genetic quality of cultivars and hybrids of different vegetables. In *Capsicum*, a molecular marker specific for a gene associated to capsaicin accumulation (pungency) in the placental tissue of the fruits (gene *Pun-1*) presents several features of interest for use in seed production systems for early diagnosis of genetic purity as well as in studies to determine cross pollination levels between accessions. The aim of this study was to evaluate the genetic quality of *C. annuum* seeds obtained on production systems established under field conditions in Brasília-DF (the Central Plateau region of Brazil). In order to determine the natural crossing rates and the effect of spatial isolation on genetic purity, plants of the cultivar *C. annuum* 'BRS Garça' (spicy fruits) were used as male parent and plants of the bell pepper *C. annuum* 'Magali R' (sweet fruits) was employed as female parent. The plots consisted of 14 rows of 20 m length, spaced 1.2 m between rows, with 20 plants in each, and the two central rows of 40 plants were transplanted access pollen donor. For analysis of the cross-pollination rate, the first ripe fruit of the female parent was harvested and the seeds were extracted, dried and packed. Seed samples were sown in a greenhouse and the young leaves of seedlings were collected for DNA extraction. Molecular analysis was performed via PCR assays with a codominant marker derived from primers targeting a segment of a gene coding for an acyltransferase (*Pun-1* gene). The experimental design was randomized blocks with six treatments and two replications, totaling 12 plots which consisted of rows with 20 plants totaling 240 plants. The molecular marker was efficient to quantify cross-pollination rates in natural (field) conditions. The natural cross-pollination rates in plants and seeds were estimated in 10.8% and 1.2%, respectively. These results indicated that this molecular marker may be helpful in the determining genetic purity during maintaining, germplasm multiplying and commercial pepper seed production.

**Keywords:** *Capsicum*, molecular marker, PCR, natural outcrossing rates, pollination.

## 1 INTRODUÇÃO

As principais espécies cultivadas de pimentas do gênero *Capsicum* são *C. annuum*, *C. baccatum*; *C. frutescens* e *C. chinense*. A distinção entre essas principais espécies podem ser feitas através das características morfológicas bem definidas dos frutos e flores (GREENLEAF, 1986; CARVALHO *et al.*, 2009). O germoplasma dessas espécies apresenta grande variabilidade que se manifestada em diversas características, incluindo arquitetura de planta, tamanho, formato, coloração, aroma e composição bioquímica dos frutos, coloração das flores e resistência múltipla a doenças (GOVINDARAJAN, 1991; BOITEUX *et al.*, 1993). A diversidade genética das várias espécies domesticadas de *Capsicum* representa uma oportunidade de utilização direta desse germoplasma em programas de melhoramento por meio da transferência de genes via cruzamentos intra e interespecíficos (PICKERSGILL, 1997); isso permite obter genótipos superiores com potencial para diversos segmentos de mercados, beneficiando tanto os pequenos agricultores como as agroindústrias (CARVALHO *et al.*, 2009). Uma peculiaridade do gênero *Capsicum* é a presença de pungência (picância) associada com a acumulação diferenciada de alcaloides na placenta dos frutos (WYATT *et al.*, 2012). De fato, o gosto picante é induzido por seis compostos quimicamente relacionados derivados do grupo dos alcaloides (capsaicinoides). A capsaicina e o seu derivativo dihidrocapsaicina apresentam os mais potentes efeitos de pungência (SUPALKOVA *et al.*, 2007). A pungência é uma característica de extremo interesse para as indústrias processadoras de molhos de pimenta (CARVALHO *et al.*, 2009).

Nas diferentes regiões do Brasil, o cultivo comercial de pimentas ainda é conduzido, majoritariamente, por pequenos agricultores em sistemas de agricultura familiar. Uma prática comum adotada por vários produtores para a implantação dos campos de produção de pimenta dentro desses sistemas tem sido o emprego de sementes próprias, ou seja, obtidas na própria lavoura (NASCIMENTO, 2004). Em geral, as sementes originais são provenientes de frutos adquiridos em mercados e feiras obtidos, na maioria dos casos, sem utilização de tecnologias adequadas para a produção. Como consequência dessas práticas, as sementes empregadas para o plantio apresenta baixa qualidade tanto fisiológica quanto genética, implicando em sérios prejuízos para o agricultor (NASCIMENTO, 2004). Além disso, cruzamentos interespecíficos naturais ocorrem entre acessos de *Capsicum* e têm sido comumente relatado em expedições de

coleta (CARVALHO *et al.*, 2009), aumentando dessa maneira as fontes naturais de contaminação genética.

Existe uma demanda crescente por novas cultivares, com melhor qualidade, alta produtividade e resistência a doenças (BOSLAND e VOTAVA, 2000). Neste contexto, a qualidade genética da semente de uma variedade (determinada por sua estabilidade fenotípica) é de extrema importância. Obviamente, algumas características varietais podem variar com o ambiente (fatores climáticos, tratos culturais, irrigação etc.). Espera-se assim que uma cultivar superior apresente a manutenção, através das gerações de cultivo, de suas características mais relevantes tais como potencial produtivo, pungência, resistência a doenças e pragas, ciclo vegetativo e reprodutivo e, aspectos nutricionais ou sensoriais dos frutos, incluindo a presença ou ausência de pungência.

O gênero *Capsicum* caracteriza-se por apresentar flores perfeitas (hermafroditas), ou seja, os órgãos reprodutivos masculinos (estames) e femininos (carpelos) juntos em uma mesma flor, o que facilita a reprodução por meio de autofecundação. Os órgãos são facilmente distinguidos facilitando os cruzamentos. Embora consideradas autógamas, as espécies de pimentas apresentam níveis significativos de polinização cruzada em cultivo em condições de campo aberto (PICKERSGILL, 1997). A taxa de polinização cruzada natural é influenciada por muitos fatores tais como: cultivar, local, época, condições climáticas, população de insetos e, espaçamento entre plantas (TANKSLEY, 1984; GEORGE, 1985). Desta forma, o isolamento e/ou a instalação de barreiras naturais é de extrema importância durante a produção de sementes de diferentes cultivares de pimenta, visando assim o controle da qualidade genética das sementes. Para a classe certificada de sementes de pimenta, o isolamento dos campos de produção deve respeitar uma distância mínima de 300 m (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Já para a produção de sementes híbridas, apesar de a polinização artificial ser realizada antes da abertura das flores femininas maduras, recomenda-se manter a separação física de campos de outros genótipos a fim de evitar riscos de contaminação genética por insetos que perfuram os botões florais em busca de pólen e néctar (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Estudos realizados em outros países têm mostrado que a polinização cruzada pode ocorrer em uma ampla faixa variando de 2 a 90% (TANKSLEY, 1984; PICKERSGILL, 1997). Em algumas cultivares de pimentas picantes, por exemplo, as flores possuem um

estilete mais comprido, e assim, a possibilidade de autopolinização é menor. Em estudo com *C. frutescens* foi verificado uma taxa de cruzamento natural variando de 9 a 38%, dependendo da cultivar (ODLAND e PORTER, 1941). No Brasil, as informações sobre as taxas de cruzamento que ocorre em pimentas e pimentões são escassas.

Em programas de melhoramento e em sistemas de produção de sementes, a caracterização da diversidade genética por meio de marcadores moleculares, seja de coleções de trabalho ou de populações naturais, é um método rápido e eficiente para selecionar os parentais que constituirão as populações segregantes para características fenotípicas de interesse de forma rápida e muito eficiente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Além disso, as técnicas moleculares têm sido empregadas no estudo da diversidade genética e em programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos (FALEIRO, 2007). As técnicas moleculares de análise do DNA são ferramentas auxiliares aos descritores morfológicos convencionais, que permitem aos pesquisadores acessar a variabilidade genética dentro e entre espécies, tendo o potencial de auxiliar na identificação de novas fontes de variabilidade e de utilidade no desenvolvimento de novas cultivares de pimenta (PRINCE *et al.*, 1995; RODRIGUEZ *et al.*, 1999).

Os programas de melhoramento genético têm interesse no desenvolvimento de cultivares de pimenta pungentes, com alto teor de capsaicina, bem como naquelas cultivares doces, sem pungência, destinadas ao mercado de condimentos secos para tempero, como páprica (CARVALHO *et al.*, 2009; WYATT *et al.*, 2012). Nos programas de melhoramento de pimenta, a detecção do ardor através da experimentação dos frutos não é eficiente, visto que a degustação continuada de pimentas causa alteração da sensibilidade das fibras nervosas dos sensores periféricos de dor das papilas bucais. A análise via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC é eficiente, mas laboriosa e de elevado custo. O marcador específico para capsaicina é um sistema de diagnóstico precoce com base na análise de DNA, potencialmente capaz de aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (OHSE *et al.*, 2010; WYATT *et al.*, 2012).

Ferramentas moleculares também têm sido empregadas em sistemas de produção para monitorar a qualidade genética das sementes de cultivares e híbridos de diferentes espécies de *Capsicum* (PRINCE *et al.*, 1995; RODRIGUEZ *et al.*, 1999). No melhoramento de *Capsicum* da Embrapa, marcadores moleculares têm sido utilizados para identificação para

genes de carotenoides, resistência a algumas doenças e detecção da presença ou ausência do alcalóide capsaicina (pungência). Um marcador molecular específico para um gene codificador de uma acil-transferase (gene *Pun-1*) foi encontrado em associação com a característica de acumulação de capsaicina (pungência) em frutos de *Capsicum* (STEWART *et al.*, 2005). Esse sistema de marcadores apresenta diversas características de interesse para utilização em sistemas de diagnóstico precoce da pureza genética bem como em estudos visando a determinação de níveis de polinização cruzada entre acessos de *Capsicum* (OHSE *et al.*, 2010; WYATT *et al.*, 2012). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a taxa de cruzamento entre dois acessos de *Capsicum annuum* em condições de campo no Planalto Central do Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

**Características do material vegetal, características ambientais e produção de mudas** – A pesquisa foi conduzida entre abril e dezembro de 2012, nos Laboratórios de Análise de Sementes e Melhoramento Genético, bem como no campo experimental da Embrapa Hortaliças, em Brasília-DF (Latitude 15° 56' Longitude 48° 08' e altitude de 997,62 m). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa – temperado úmido com inverno seco e verão quente.

Para determinar a taxa de cruzamento natural, foram utilizados dois acessos (pares) da espécie *C. annuum* cultivados em diferentes distâncias físicas. O estudo foi realizado em uma área de 336 m<sup>2</sup>. Um dos acessos foi selecionado tendo em seu genoma um marcador fenotípico de herança recessiva (não-pungente) do qual foram extraídas sementes. Desta forma, plantas originárias de cruzamento podem ser imediatamente distinguidas das plantas resultantes de autofecundação já na geração F<sub>1</sub>. Neste caso, a ocorrência ou não do cruzamento natural é estimada através da percentagem de plantas (sementes) que manifestam a característica fenotípica dominante (pungente). As características fenotípicas escolhidas para cada espécie de *C. annuum* foram frutos pungentes e não-pungentes. Para medir o sentido do cruzamento, sementes da cultivar de pimenta ‘BRS Garça’ foram utilizadas como genitor masculino e o pimentão ‘Magali R’ como genitor feminino (**Anexo 1**). A cultivar doadora de pólen possui o gene marcador dominante responsável pela característica picante; desta maneira, as plantas oriundas de sementes colhidas das plantas receptoras, quando resultantes de cruzamentos naturais, teriam necessariamente que apresentar pungência.

Para a formação das mudas, a semeadura foi feita em bandejas de poliestireno expandido (isopor) com 200 células, contendo substrato agrícola Bioplant constituído por casca de pinus, esterco, serragem, fibra de coco, vermiculita, casca de arroz, cinza, gesso agrícola, carbonato de cálcio, magnésio, termofosfato magnésiano (Yoorin) e micronutrientes. As sementes do genitor masculino foram semeadas em épocas distintas, com intervalos de uma semana (em 18/04/2012, 02/05/2012 e 17/05/2012), visando proporcionar uma situação de máxima coincidência de floração entre os materiais. O genitor feminino foi semeado em 02/05/2012. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação.

**Ensaio de campo para estimar taxas de cruzamento natural** – O ensaio para a produção de sementes foi conduzido na área experimental da Embrapa Hortaliças preparada convencionalmente, e as correções foram feitas de acordo com a análise química do solo. As adubações, assim como os demais tratamentos culturais, foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura (FILGUEIRA, 2003; RIBEIRO *et al.*, 1999). Embora existam outras formas de desenhos utilizados na determinação da taxa de alogamia, optou-se por linhas paralelas (BERI *et al.*, 1985). O transplante das mudas foi realizado após 40 dias. As parcelas foram compostas de 14 linhas de 20 m de comprimento, com 20 plantas em cada, espaçadas de 1,2 m entre linhas, sendo que as duas fileiras centrais foram transplantadas 40 plantas do acesso doador de pólen ('BRS Garça'), e as demais fileiras, ou seja, 240 mudas do receptor de pólen ('Magali R'). O plantio constituiu de linhas em diferentes distâncias físicas do genitor masculino tanto à direita quanto à esquerda, espaçadas a 1,2; 2,4; 3,6; 4,8; 6,0 e 7,2 m. As plantas foram identificadas individualmente e cada planta constituiu de uma repetição.

**Observações fenológicas e presença de insetos polinizadores** – A antese das flores ocorreu no início de julho. Durante a fase de florescimento, a precipitação foi nula e as médias das temperaturas máxima e mínima foram de 27,8°C e 15,9°C, respectivamente. A média mensal da umidade relativa foi de 48%. Foram feitas visitas semanais, constatando-se a presença de diversas espécies de insetos polinizadores. A presença dos insetos nas flores foi anotada e amostras foram coletadas e mantidas em álcool a 70% para análise entomológica combinando caracteres morfológicos e moleculares.

**Obtenção de sementes em condições de campo** – O primeiro fruto maduro foi colhido em cada planta oriunda do genitor feminino. As sementes foram extraídas manualmente com o auxílio de um estilete em condições de laboratório. Após a extração, as sementes foram secas, embaladas e armazenadas apropriadamente para a realização dos experimentos subsequentes.

**Avaliação das taxas de polinização cruzada empregando marcadores moleculares** – Nessa etapa do trabalho, 16 sementes de cada planta foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) com 200 células, contendo substrato agrícola *Bioplant*<sup>®</sup>, perfazendo o total de 3.840 plântulas. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação. Quando as plântulas apresentaram 3 a 4 folhas definitivas, coletou-se amostras para extração de DNA (**Anexo 2**).

**Extração de DNA** – Os testes moleculares foram realizados nos Laboratórios de Melhoramento Genético e de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças. O DNA foi extraído de folhas jovens segundo a metodologia de purificação utilizando CTAB com modificações (BOITEUX *et al.*, 1999). Inicialmente, a extração de DNA foi feita em conjunto (*bulk* de 16 plugs de folha jovem) de cada família, usando amostras das 16 plantas, ou seja, 240 extrações. Foi retirado de cada folha um disco de 1 cm de diâmetro e colocado em um microtubo. A extração de DNA dos pais foi feita de forma individual, porém, com 16 extrações de cada. Na capela, foi adicionado ao microtubo 750 µL de tampão CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) [2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; β-mercaptoetanol 0,2% (v/v)], homogeneizado (Precellys 24) e aquecido a 65°C em banho-maria por dez minutos. O extrato obtido foi submetido a uma extração de 750 µL de clorofil (clorofórmio - álcool isoamílico 24:1 v/v), agitado em vortex e centrifugado a 9.000 rpm por cinco minutos. Decorrido o tempo, foi retirado 600 µL do sobrenadante e transferido para tubo eppendorff de 1,5ml, o DNA na fase aquosa foi precipitado pela adição de 300 µL de isopropanol gelado. A mistura foi submetida a uma leve agitação e posterior centrifugação a 12.000 rpm por 13 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o DNA aderido ao fundo do tubo foi lavado com etanol 70% para remoção dos resíduos de isopropanol e de sais. Os microtubos foram colocados por 20 minutos em estufa a 37°C. O DNA foi ressuspedido em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e incubado por 24 horas a 4°C (**Anexo 3**). A concentração e a qualidade do DNA genômico foram estimados por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) conforme as recomendações do fabricante. Após a verificação da integridade do DNA, procedeu-se também o ajuste da concentração de DNA das amostras para 40ng/ µL de forma a padronizá-las.

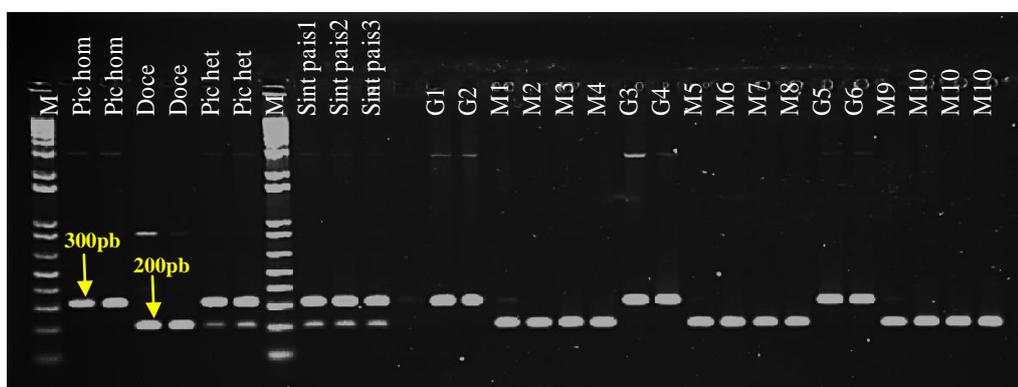
**Análise via PCR** – A análise molecular foi realizada mediante o emprego da técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”), utilizando *primers* desenvolvidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia os quais são capazes de gerar um marcador codominante associado com a acumulação do alcaloide capsaicina (OHSE *et al.*, 2010). Nas reações de PCR, o marcador molecular codominante amplifica um fragmento de 300 pb do gene *Pun-1* em materiais pungentes e de 200 pb em materiais não pungentes (OHSE *et al.*, 2010). As reações de amplificação do DNA genômico foram realizadas via PCR em termocicladores Applied Biosystems, modelo Gene Amp PCR System 9700. Utilizou-se 15 minutos a 95 °C para desnaturação, seguido de 35 ciclos consecutivos de 30 segundos a 94 °C, 3 minutos a 62 °C, 2 minutos a 72 °C, e mais uma etapa para a completa extensão de todas as cadeias

complementares de 15 minutos a 68 °C (**Anexo 4**). Para cada reação de amplificação, utilizou-se a seguinte concentração de cada reagente: 2,0 µL de DNA a 90 ng/µL; 9,67 µL de água milli-Q autoclavada; 2,0 µL Tampão 10X com 15mM de MgCl<sub>2</sub>; 3,2 µL de dNTP 2,5 mM; 2,0 µL de Bovine Serum Albumine (BSA) 2,5 mM; 0,31 µL de cada *primer* 3,2 mM e 0,2 µL de enzima *Taq* DNA polimerase 5U/ µL, totalizando 20µL de reação. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, 5 µg/mL em água. Os resultados foram visualizados em luz UV, fotodocumentados em sistema digital e analisados. Os géis foram revelados e as bandas de interesse foram registradas para posterior interpretação. A análise com os marcadores moleculares foi inicialmente conduzida com um *bulk* sintético combinando DNA genômico obtido de 15 plantas de ‘Magali R’ com o DNA genômico de uma planta de ‘BRS Garça’ (todos ajustados para 40ng/ µL). Esse *bulk* sintético foi desenvolvido com o objetivo de verificar a eficiência do protocolo desenvolvido por OHSE *et al.* (2010) para detectar o marcador associado com a pungência de frutos. Após confirmar a detecção de contaminação (banda de 300 pb) dentro dos *bulks*, os mesmos foram abertos e a extração de DNA foi conduzida individualmente com todas as 16 plantas dos *bulks* com sinais de contaminação para verificar o número de plântulas resultantes de polinização cruzada. Com base na posição da banda (amplicon) foi determinado o número de alelos por locus para todos os indivíduos amostrados, podendo inferir, desta forma, sobre a taxa de contaminação de pólen em condições naturais.

**Delineamento experimental e análise estatística** – O delineamento estatístico utilizado foi em blocos ao acaso, com seis tratamentos e duas repetições, totalizando 12 parcelas que se constituíram de linhas com 20 plantas perfazendo o total de 240 plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa GENES (ANOVA).

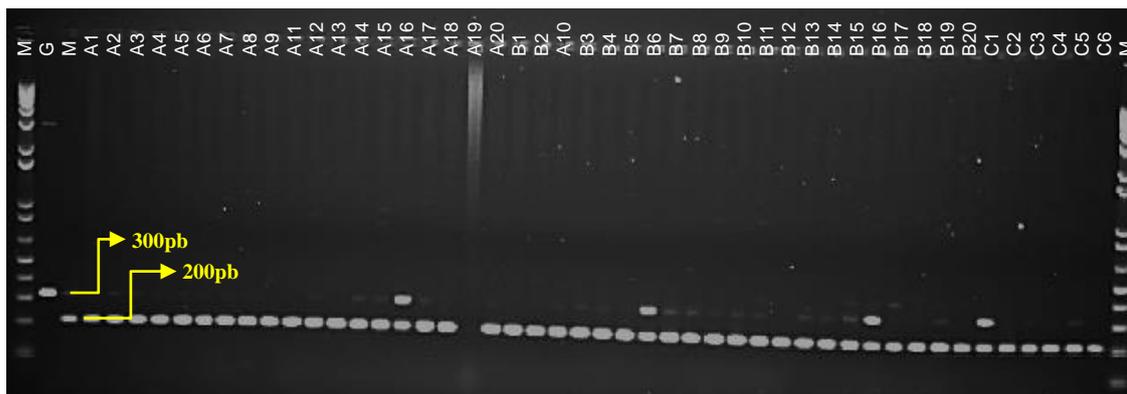
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise via PCR utilizando o marcador para pungência foi eficiente para detectar um único indivíduo contaminante dentro dos *bulks* de DNA extraídos, formados por 15 indivíduos de plantas de ‘Magali R’ (**Figura 1**) artificialmente contaminadas com uma amostra de DNA do material pungente (‘BRS Garça’).



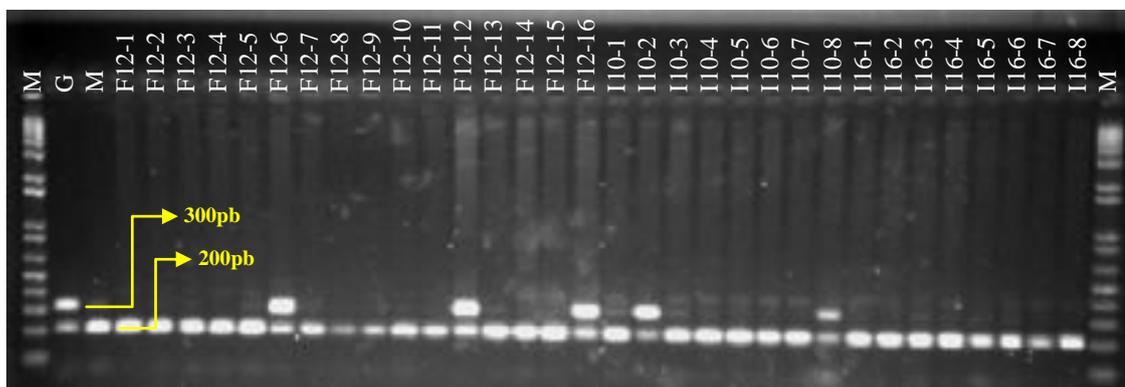
**Figura 1.** Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do perfil de amplicons do marcador codominante derivado do locus de pungência *Pun-1*. **Linha de corrida M** = marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); **Pic hom** = Linhagens CNPH 990 e CNPH 2725 homozigotas para o locus *Pun-1*; **Doce** = linhagens ‘CNPH 196’ e ‘CNPH 581’ sem presença de *Pun-1*; **Pic het** = Linhagens CNPH 305-1 e CNPH 653-1 heterozigotas para o marcador *Pun-1*; **Sint pais 1, 2 e 3** = três repetições de bulks sintéticos misturando uma amostra de DNA de ‘BRS Garça’(pungente) com 15 amostras de DNA de ‘Magali R’; **G** = ‘BRS Garça’ (genitor masculino); **M** = ‘Magali R’ (genitor feminino); **G1 a G6** = amostras de ‘BRS Garça’ e **M1 a M10** = amostras de ‘Magali R’. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.

O marcador foi capaz de detectar os alelos de pungência da cultivar ‘BRS Garça’ nas 240 progênies de ‘Magali R’ obtidas em condições de campo (**Anexo 5**), confirmando assim que o marcador associado com a presença de capsaicina é eficiente para quantificar as taxas de cruzamento natural nas plantas (**Figura 2**).



**Figura 2.** Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do perfil de amplicons PCR dos marcadores codominantes derivados do locus de pungência *Pun-1*. **Linha de corrida M** = marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); **G** = ‘**BRS Garça**’ (genitor masculino); **M** = ‘**Magali R**’ (genitor feminino). **A1 a A20; B1 a B20 e C1 a C6** = bulks misturando 16 amostras de DNA de ‘Magali R’ a partir de progênes obtidas de frutos fecundados naturalmente em condições de campo. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.

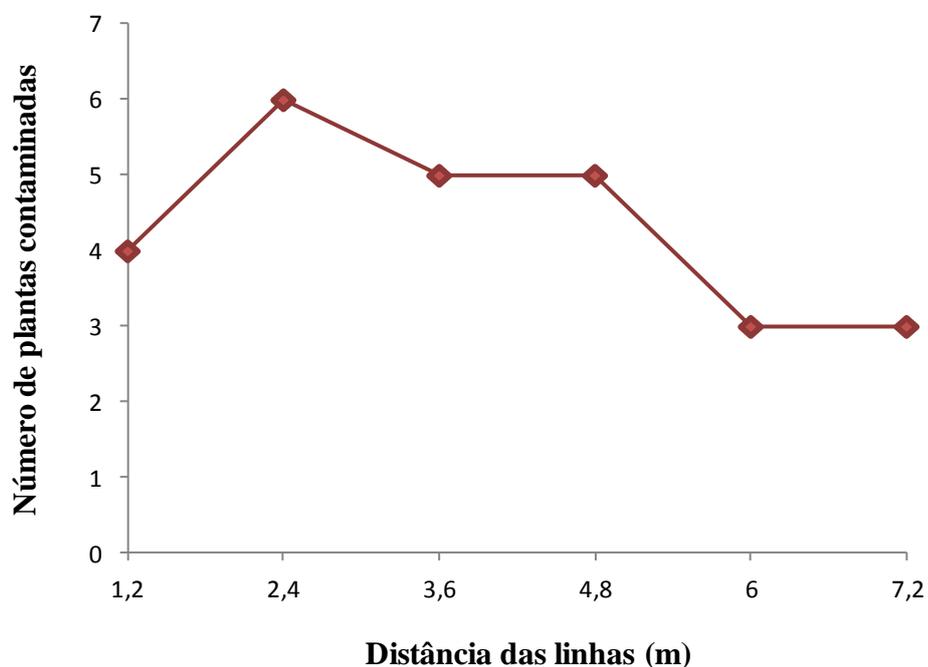
Com base na posição da banda por região de migração (locus), foi possível inferir sobre o número de sementes contaminadas (**Figura 3**). Os marcadores moleculares são amplamente utilizados em análises genéticas com as mais diversas finalidades, tais como identificação de clones, linhagens, cultivares, híbridos, taxa de diversidade, fluxo gênico e, atualmente, na quantificação da taxa de cruzamento (BUSO *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Análise em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do perfil de amplicons do marcador codominante derivado do locus de pungência *Pun-1*. **Linha de corrida M** = marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); **G** = ‘**BRS Garça**’ (genitor masculino); **M** = ‘**Magali R**’ (genitor feminino) seguidos do perfil de amplicons obtidos dos materiais em teste nas demais colunas. Família (progênie) F12-1 a F12-16; I10-1 a I10-8; I16-1 a I16-8. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.

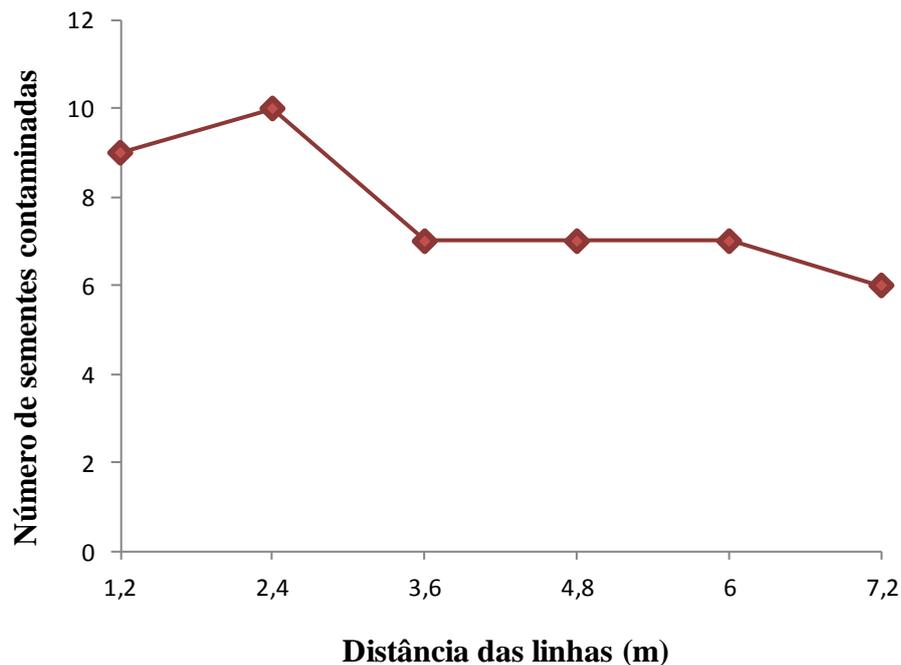
Verificou-se uma redução significativa na taxa de cruzamento natural entre os dois acessos com o aumento da distância entre os mesmos. Para o número de plantas, em ordem crescente de aumento na distância da fonte de pólen com o gene *Pun-1* (‘BRS Garça’), foi de 4, 6, 5, 5, 3 e 3 plantas, ou seja, leve declínio (**Figura 4**). Embora não houve diferenças

significativas entre as distâncias, na prática, uma planta encontrada no meio de um campo de produção de sementes já seria suficiente para condená-lo.



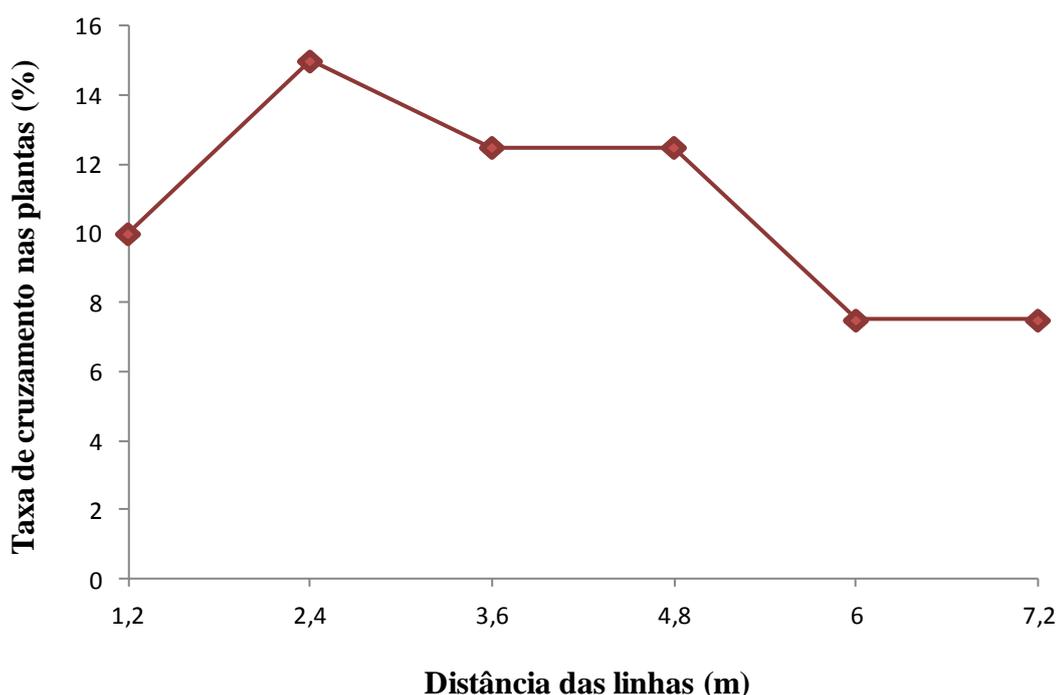
**Figura 4.** Plantas de pimentão ‘Magali R’ contaminadas com pólen de pimenta ‘BRS Garça’ como indicado pela análise com o marcador molecular codominante derivado do gene *Pun-1*. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.

Para o número de sementes, em ordem crescente de aumento na distância, foi de 9, 10, 7, 7, 7, 6, ou seja, leve diminuição. Embora as distâncias não se diferiram estatisticamente, visualmente houve leve tendência a atenuar o número de sementes conforme aumentava a distância (**Figura 5**).



**Figura 5.** Sementes oriundas de plantas de pimentão ‘Magali R’ contaminadas com pólen de pimenta ‘BRS Garça’ como indicado pela análise com o marcador molecular codominante derivado do gene *Pun-1*. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.

A taxa média de cruzamento natural entre as plantas foi de 10,8%, valor muito alto e inaceitável para um campo de produção de sementes. A faixa de distância em que mais ocorreu contaminação genética foi a de 2,4 m e, à medida que a distância aumentava, diminuía a taxa de cruzamento natural (**Figura 6**). Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos. Em ervilha, também nas condições de Brasília, a taxa de cruzamento entre cultivares variou de 0,12% a 0,80% em dois arranjos diferentes. A uma distância de 3,0 m, ocorreu a taxa de polinização cruzada de 0,12%, e quando esta distância foi reduzida para 1,0 m, a taxa de cruzamento natural foi de 0,24% (GIORDANO *et al.*, 1991). No sul do país, a taxa de alogamia em ervilha variou de 0,98% a 21,19% com espaçamento entre linhas de 0,3 m, e quando a distância aumentou para 1,0 m a taxa de cruzamento caiu para 0% (OLIVEIRA, 1963). Em arroz, para uma distância de 0,5 m, a taxa média de polinização cruzada entre as cultivares Guarani e IAC 201 foi de 0,30% e 0,35% em duas regiões distintas (SILVA *et al.*, 2005). Considerando que em condições de campo o fluxo de pólen pode ocorrer em ambos os sentidos, a taxa de cruzamento natural observada nas progênies quando ocorreu plena coincidência de floração, variou de 6 a 14%.



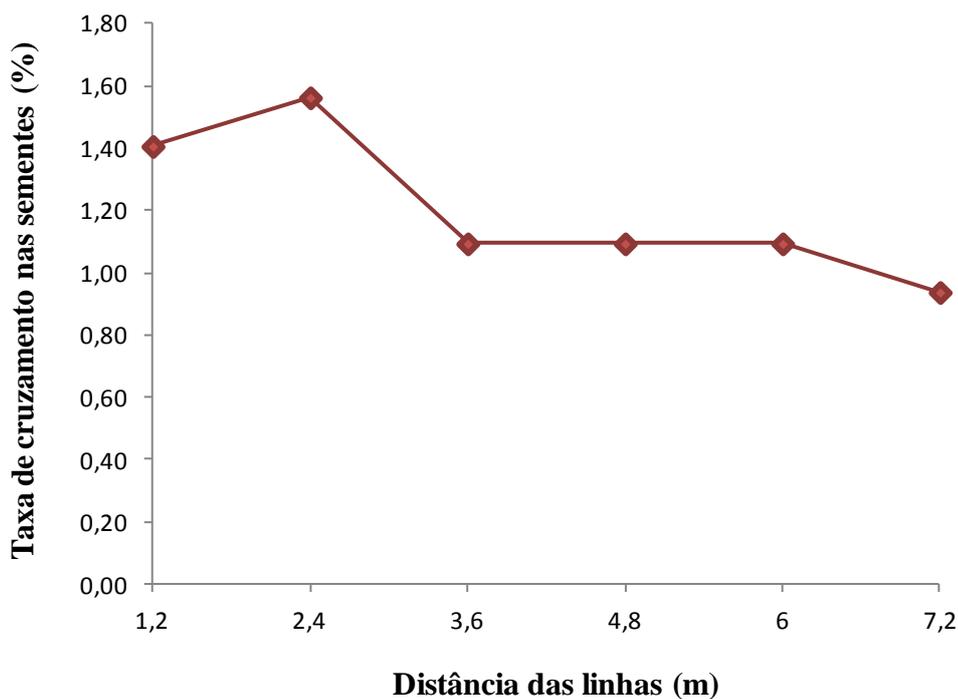
**Figura 6.** Taxa de cruzamento natural em plantas de pimentão 'Magali R' como indicado pela análise com o marcador molecular codominante derivado do gene *Pun-1*. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.

Em média, a taxa de contaminação genética apresentada nas sementes foi de 1,2%, com leve tendência a diminuir conforme aumentava a distância entre os genitores (**Figura 7**). Diferenças nas taxas de cruzamento em populações diferentes de uma mesma espécie podem ser explicadas, dentre outros, pelo tipo de marcador fenotípico/molecular utilizado, pela época de plantio, distribuição espacial das plantas, sobreposição de florescimento, densidade de insetos polinizadores e compatibilidade.

A qualidade genética das sementes envolve a pureza varietal, potencial de produtividade, resistência a pragas e doenças, precocidade e resistência às condições adversas de solo, clima, dentre outros. Essas características são, em maior ou menor grau, influenciadas pelo meio ambiente, sendo melhores identificadas quando o desenvolvimento das plantas são inspecionando em nível de campo. A presença de insetos durante a condução do experimento é aspecto positivo a ser considerado, pois envolve uma relação planta-inseto no tocante à polinização. No presente estudo, foi verificada durante o período de floração, a presença de uma ampla gama de insetos visitando as flores: *Trigona spinipes* (Hymenoptera: Apidae), *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Hippodamia* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Scymnus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), sp1 (Diptera: Syrphidae), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), *Musca* (Diptera: Muscidae), sp1 e sp2 (Hymenoptera: Vespidae) e *Tuta Absoluta*

(Lepidoptera: Gelechiidae). Assim, concluiu-se que estes foram possivelmente, os principais agentes responsáveis pela polinização natural de *C. annuum* em nossas condições experimentais.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se o isolamento dos campos de produção de sementes de pimenta, a fim de evitar contaminação genética através da polinização cruzada, ou seja, troca de grãos de pólen entre diferentes cultivares. A melhor proteção contra a fertilização por pólen estranho é suprir abundantemente de pólen da própria variedade na ocasião em que o estigma estiver receptivo. Nessa situação, a chance de pólen estranho vir a realizar a fecundação é pequena. Na prática, entretanto, esse artifício precisa ser complementado pelo isolamento do campo (PESKE *et al*, 2006).



**Figura 7.** Taxa de cruzamento natural em sementes de pimentão 'Magali R' como indicado pela análise com o marcador molecular codominante derivado do gene *Pun-1*. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2013.

#### 4 CONCLUSÕES

1. O marcador molecular específico para capsaicina mostrou-se eficiente para quantificar as taxas de cruzamento natural entre acessos de *C. annuum* em condições naturais no Planalto Central. A taxa de cruzamento natural que ocorreu nas plantas e sementes foi de 10,8% e 1,2% respectivamente.
2. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de isolamento dos campos de produção de sementes de *C. annuum*, a fim de evitar contaminação genética através da polinização cruzada, ou seja, troca de grãos de pólen entre diferentes cultivares.
3. Estes resultados poderão ser úteis na identificação da pureza genética das sementes por meio de marcador molecular, bem como na manutenção, multiplicação de germoplasma e na produção de sementes, com ênfase no isolamento dos campos de produção, tendo em vista à preservação da pureza genética a fim de assegurar a qualidade das sementes produzidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERI, S. M.; SOHOO, M. S.; SHARMA, H. L. Estimates of natural cross pollination in egyptian clover. **Euphytica**, v.34, p.147-151, 1985.

BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic *fingerprinting* analysis in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.124, p.32-38, 1999.

BOITEUX, L.S.; NAGATA T.; DUTRA, W.P.; FONSECA, M.E.N. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. **Euphytica**, v.67, p. 89-94, 1993.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and spice Capsicums**. Oxon: CABI Publishing, 2000, 204p.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; AMARAL, Z. P. de S.; BRONDONI, R. V.; Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.30, p.46-50, 2003.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, 2009.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007, 102p.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, 1996, 220p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló.** Viçosa, MG: UFV, 2003, 333p.

GEORGE, R. A. T. **Vegetable seed production.** New York: Longman Inc., 1985, 318p.

GIORDANO, L. B.; MARQUES, M. R. C.; MELO, P. E. Estimativa da taxa de cruzamento natural em ervilha. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.9, n.2, p.82-83, 1991.

GOVINDARAJAN, V. S. *Capsicum*: production, technology, chemistry, and quality – II: processed, standards, world production and trade. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.29, p.435–474, 1991.

GREENLEAF W. H. Pepper Breeding. In: p. 67–134. **Breeding Vegetable Crops.** M.J. BASSETT (Ed.) AVI Publishing, Westpoint, Connecticut, 1986.

NASCIMENTO, W .M. Mercado de sementes de pimentas no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DO AGRONEGÓCIO PIMENTAS (*Capsicum* sp.), **Anais...** Brasília: Embrapa Hortaliças, 1, 2004. (CD-ROM).

NASCIMENTO, W. M.; DIAS, D. C. F. S.; FREITAS, R. A. Produção de sementes de pimentas: cultivo da pimenta. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.235, 2006.

ODLAND, M. L.; PORTER, A. M.. A study of natural crossing in peppers (*Capsicum frutescens*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.38, p.585-588, 1941.

OHSE, B. J. G.; FUSCALDI, J. L.; BUSO, G. S. C.; CARVALHO, S. I. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; FERREIRA, M. E. Ausência de ardor em pimenta causada por SNPs detectados no gene Pun1 de *Capsicum annuum*. In: 56º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, **Resumo...** São Paulo: Guarujá, 2010.

OLIVEIRA, H. A. Ocorrência de alogamia em ervilha. **Revista olericultura**, v.3, p.83-90, 1963.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* sp. **Euphytica**, v.96, p.129-133, 1997.

PESKE, S. T.; LUCCA FILHO, O. A.; BARROS, A. C. S. A. Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos. 2 ed. ver. e ampl. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, 2006, 470p.

PRINCE, J. P.; LACKNEY, V. K.; ANGELES, C.; BLAETH, J.; KYLE, M. M. A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the *fingerprinting* of pepper cultivars. **Genome**, Ottawa, v.38, p.224-231, 1995.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5ª aproximação**. Viçosa: CFSEMG, 1999, 359p.

RODRIGUEZ, J. M.; BERKE, T.; ENGLE, L.; NIENHUIS, J. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p. 147-156, 1999.

SILVA, E. F.; SILVA, L. M.; MONTALVÁN, R. Crossing rate and distance in upland Rice. **Revista Bragantia**, Campinas, v.64, n.2, 2005.

STEWART, C. JR.; KANG, BYOUNG-CHEORL; LIU, K.; MAZOUREK, M.; MOORE, S. L.; YOO, E. Y.; KIM, BYUNG-DONG; PARAN, I.; JAHN, M. M. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. **The Plant Journal**, v.42, p.675–688, 2005.

SUPALKOVA, V.; STAVELIKOVA, H.; KRIZKOVA, S.; ADAM, V.; HORNA, A.; HAVEL, L.; RYANT, P.; BABULA, P.; KIZEK, R. Study of capsaicin content in various parts of pepper fruit by liquid chromatography with electrochemical detection. **Acta Chimistry Slovenia**, v.54 p.55-59, 2007.

TANKSLEY, S. D. High rates of cross-pollination in chile pepper. **HortScience**, v.19, n.4, p.580-582, 1984.

WYATT, L. E.; EANNETTA, N. T.; STELLARI, G. M.; MAZOUREK, M. Development and application of a suite of non-pungency markers for the Pun1 gene in pepper (*Capsicum* spp.). **Molecular Breeding**, v.30, p.1525-1529, 2012.

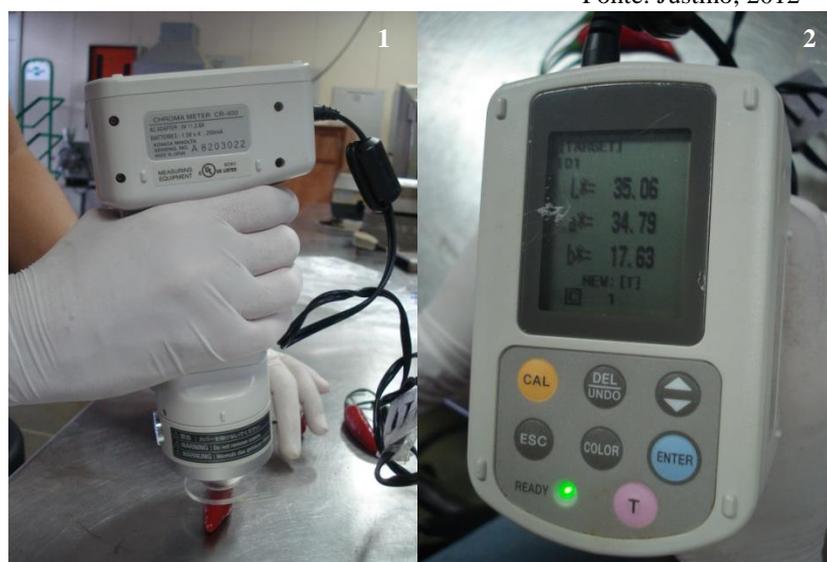
## ANEXOS CAPÍTULO I

Fonte: Justino, 2012



**Anexo 1.** Campo de produção de sementes de pimenta de pimenta cv. BRS Mari. Embrapa Hortaliças, Brasília-2012.

Fonte: Justino, 2012



**Anexo 2.** Colorimetria pelo sistema L\* a\* b\*.

Fonte: Justino, 2012



Anexo 3. Aspectos da análise do teor de clorofila no pericarpo dos frutos.

Fonte: Justino, 2012



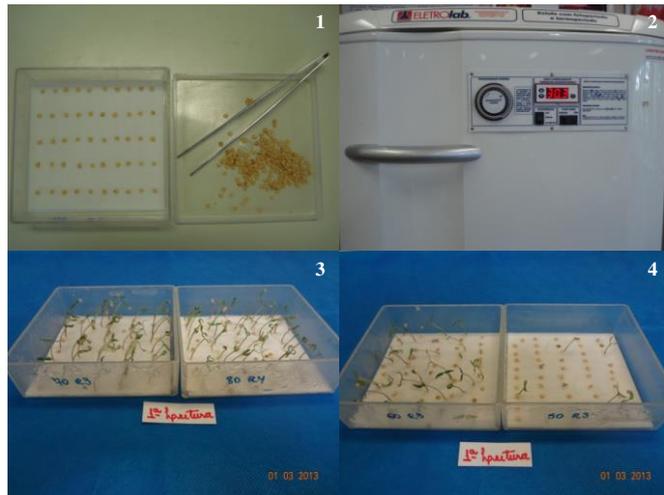
Anexo 4. Mensuração do comprimento dos frutos.

Fonte: Justino, 2012



Anexo 5. Extração dos capsaicinóides no pericarpo, placenta e sementes.

Fonte: Justino, 2013



Anexo 6. Teste de germinação de sementes de pimenta.

Fonte: Justino, 2012

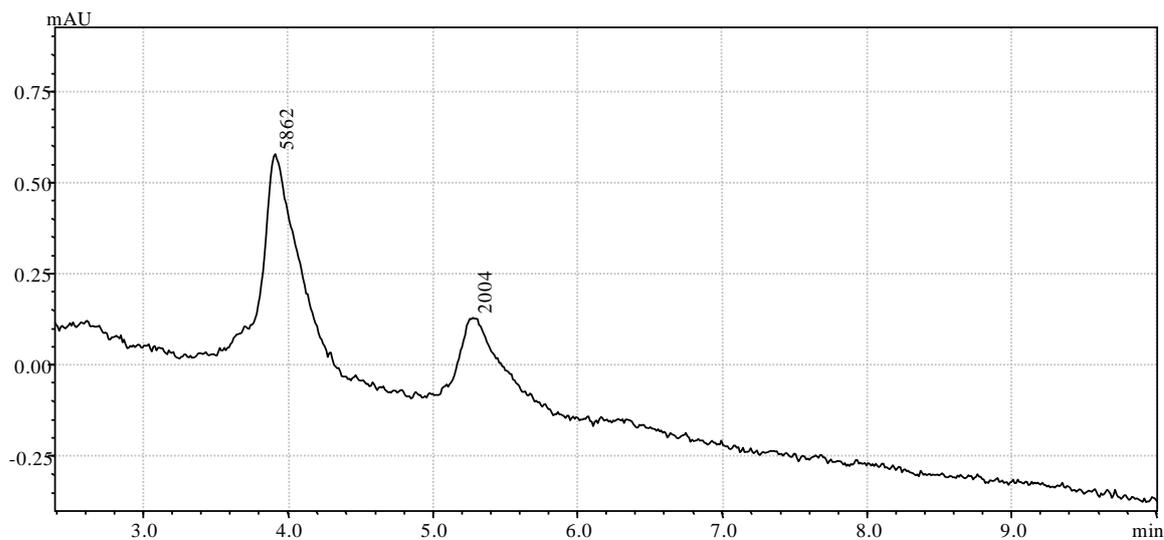


Anexo 7. Emergência plântulas em casa de vegetação.

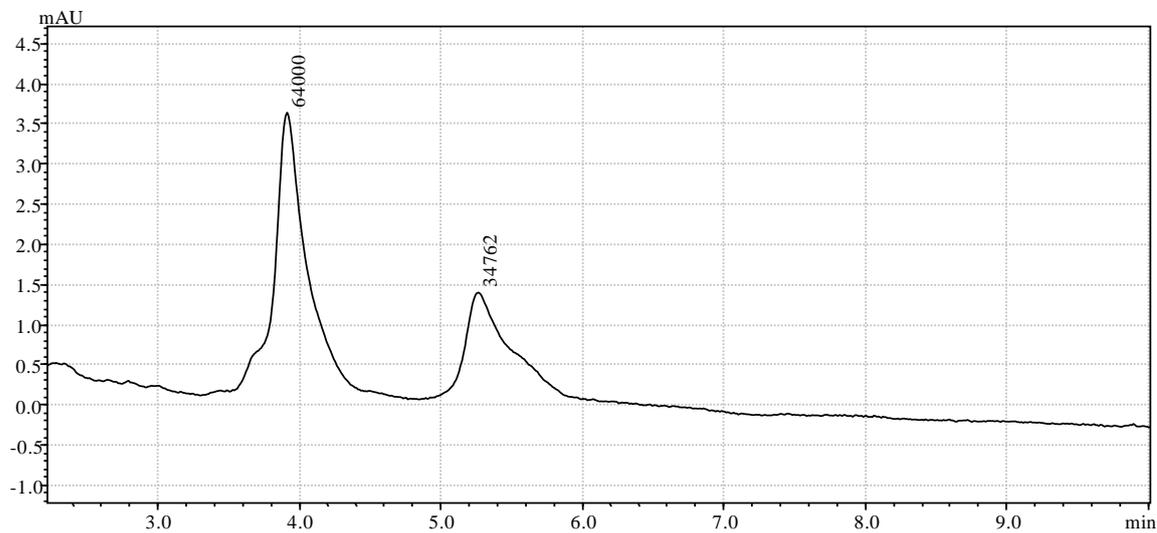
Fonte: Justino, 2012



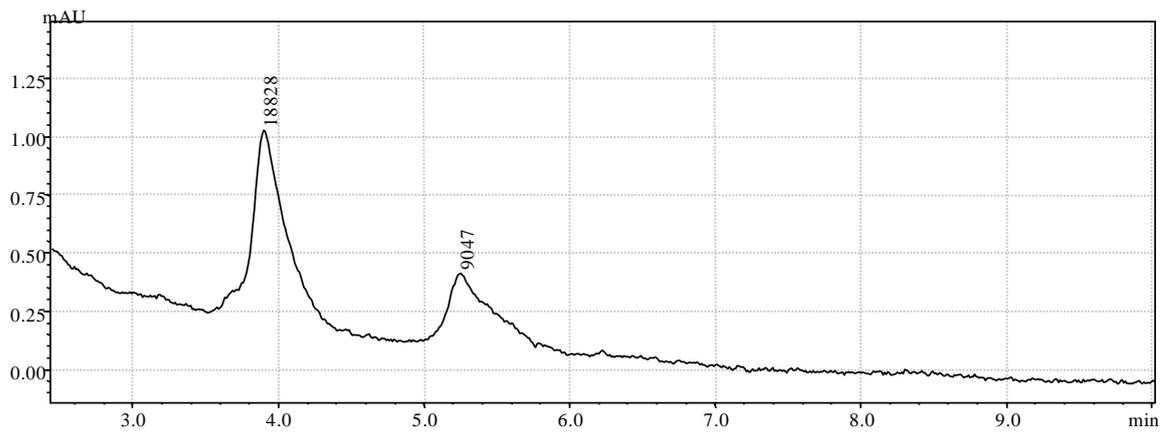
Anexo 8. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta.



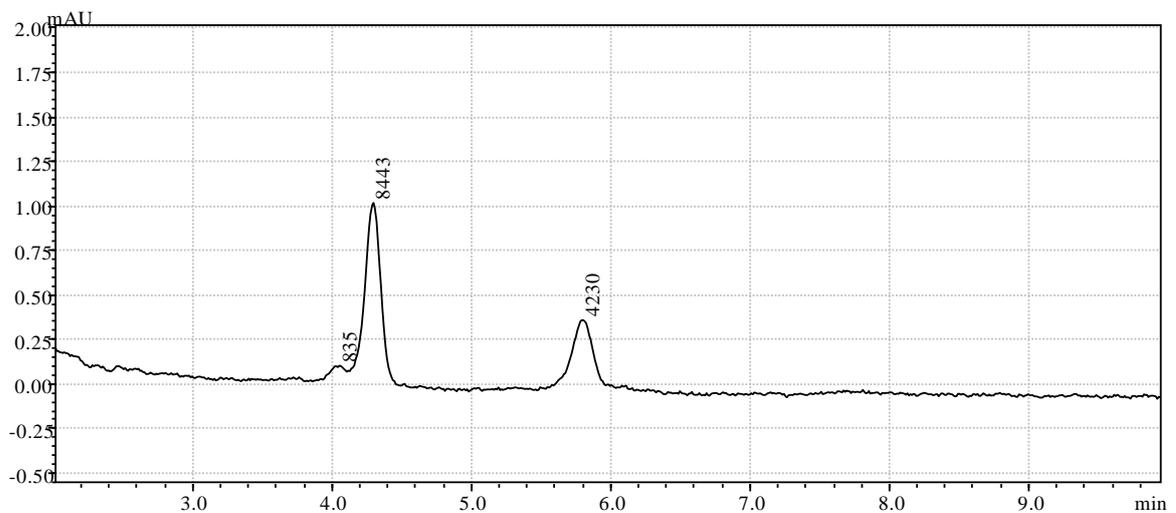
**Anexo 9.** Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes no pericarpo de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 30 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.



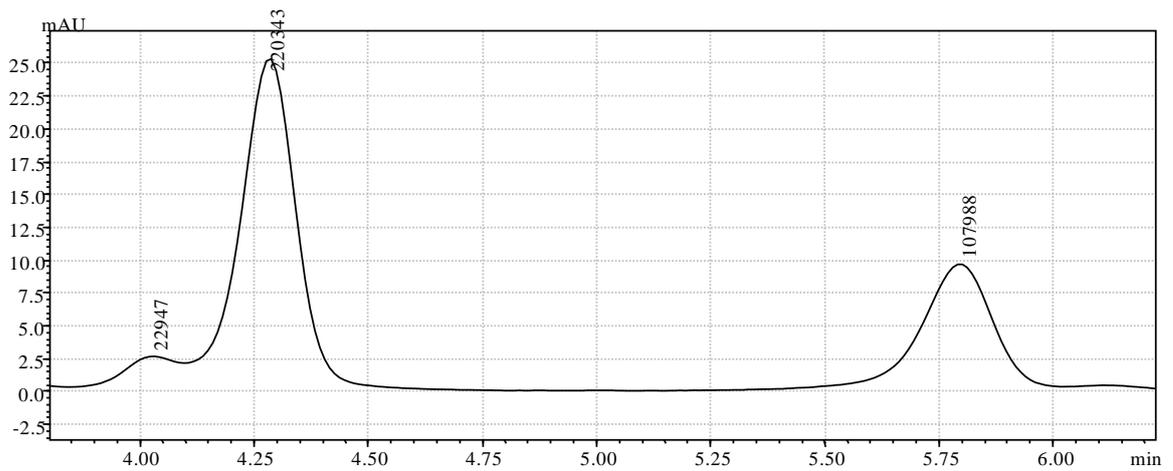
**Anexo 10.** Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes na placenta de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 30 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.



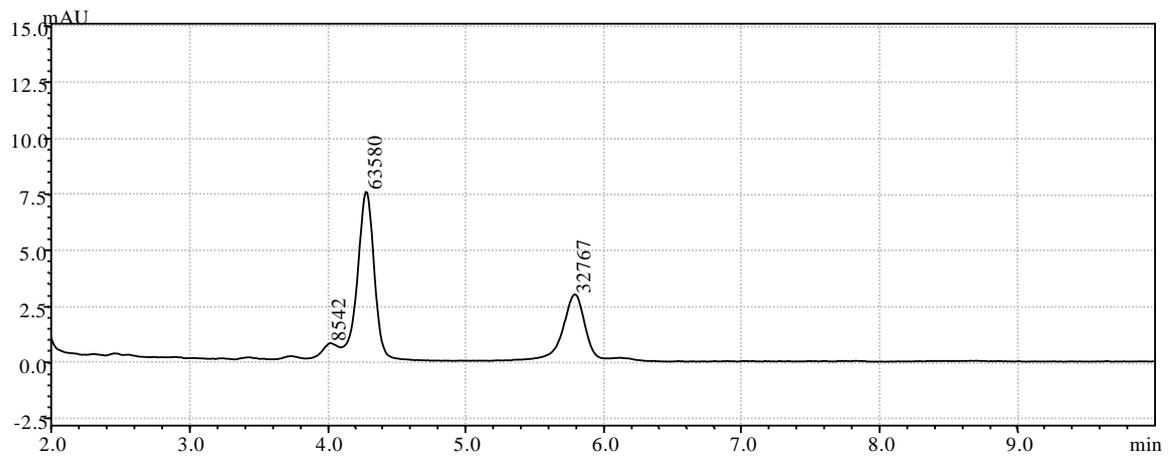
**Anexo 11.** Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes nas sementes de pimenta cv. BRS Mari com 30 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.



**Anexo 12.** Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes no pericarpo de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 70 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.



**Anexo 13.** Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes na placenta de frutos de pimenta cv. BRS Mari com 70 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.



**Anexo 14.** Cromatograma dos picos dos capsaicinóides presentes nas sementes de pimenta cv. BRS Mari com 70 DAA, à 280nm, obtido por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.

## ANEXOS CAPÍTULO II

Fonte: Justino, 2013



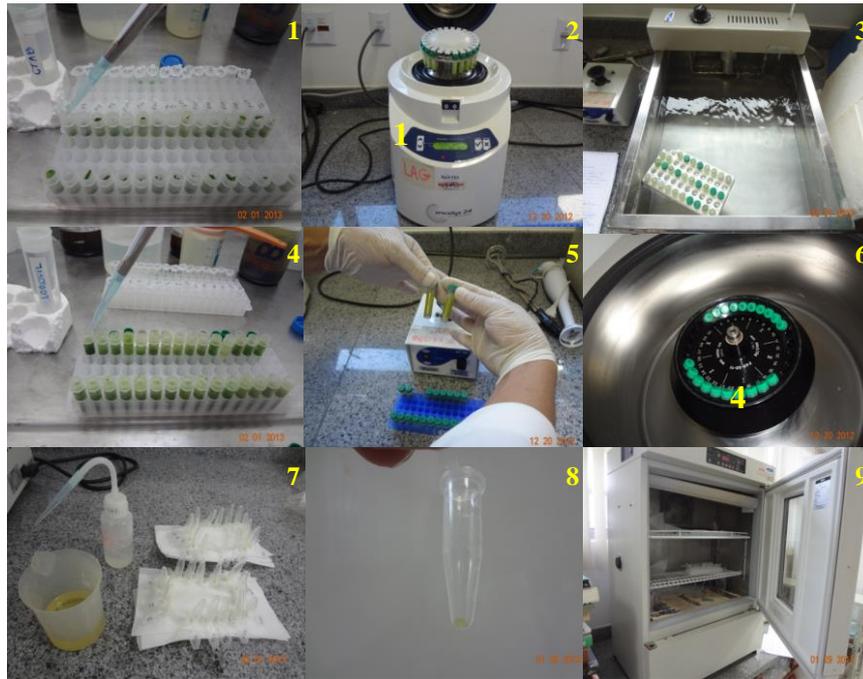
**Anexo1.** Genitor masculino (1) e genitor feminino (2). Embrapa Hortaliças, Brasília-2012.

Fonte: Justino, 2013



**Anexo 2.** Progenitores (1) e plug de folha jovem (2). Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.

Fonte: Justino, 2013



Anexo 3. Extração de DNA. Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.

Fonte: Justino, 2013



Anexo 4. Aspectos da técnica de Polymerase Chain Reaction - PCR. Embrapa Hortaliças, Brasília-2013.