

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Diversidade morfoagronômica e taxa de cruzamento natural em pimentas
Capsicum chinense

Iris Satie Hayashi Shimano

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Iris Satie Hayashi Shimano
Engenheira Agrônoma

Diversidade morfoagronômica e taxa de cruzamento natural em pimentas
Capsicum chinense

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Shimano, Iris Satie Hayashi

Diversidade morfoagronômica e taxa de cruzamento natural em pimentas (*Capsicum chinense*) / Iris Satie Hayashi Shimano. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011- - Piracicaba, 2018.

49 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Pimenta 2.Variabilidade genética 3. Marcadores morfológicos 4. Sistema reprodutivo I. Título

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiróz' da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro a esta dissertação.

À Prof. Elizabeth Ann Veasey, pela orientação, ensinamentos, compreensão e todo apoio durante todo o período do mestrado.

Ao Prof. Fernando Angelo Piotto, pela imensa colaboração, ensinamentos, paciência e dedicação.

À Arlete e ao Instituto Agronômico de Campinas pelo fornecimento de germoplasma.

Ao Departamento de Genética pela oportunidade de executar os experimentos e disponibilização da infraestrutura.

A todos os funcionários e técnicos, que contribuíram para a condução dos trabalhos, em especial José Carmezini pela competência e colaboração em todas as etapas do experimento e avaliações.

Ao Marcos Cella, Ana Flávia, Flaviane, Gabriel, João e ao pessoal da salinha com que convivi.

Aos colegas e estagiários do grupo de trabalho de melhoramento de hortaliças.

De maneira geral, a todos que ajudaram no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
REFERÊNCIAS	9
2. DIVERSIDADE MORFOAGRONÔMICA DE PIMENTAS <i>CAPSICUM CHINENSE</i>	11
RESUMO	11
ABSTRACT	11
2.1. INTRODUÇÃO	12
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.2.1. Material avaliado.....	13
2.2.2. Local e condução do experimento	13
2.2.3. Caracterização morfoagronômica:	14
2.2.4. Análise Estatística:	15
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
2.3.1. Análise descritiva.....	16
2.3.2. Análise de agrupamentos	22
REFERÊNCIAS	26
3. TAXA DE CRUZAMENTO EM <i>CAPSICUM CHINENSE</i>	31
RESUMO	31
ABSTRACT	31
3.1. INTRODUÇÃO	32
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.3.1. Considerações sobre a metodologia da estimativa da taxa de cruzamento.....	35
3.3.2. Taxa de cruzamento em <i>C. chinense</i>	38
3.3.3. Implicações práticas	42
REFERÊNCIAS	42
4. CONCLUSÕES	45
APÊNDICE	47

RESUMO

Diversidade morfoagronômica e taxa de cruzamento natural em pimentas (*Capsicum chinense*)

Estudos sobre diversidade e sistema reprodutivo das plantas cultivadas são de fundamental importância para o planejamento e elaboração dos programas de melhoramento bem como para a conservação e uso de recursos genéticos. Este trabalho é composto por duas etapas em que se objetivaram em primeiro momento caracterizar morfoagronomicamente 40 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) do banco de germoplasma da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, gerando informações que subsidiaram a metodologia para a estimativa da taxa de cruzamento natural para acessos desta espécie. A caracterização foi realizada para 16 descritores, sendo observada alta diversidade para os caracteres de hábito de crescimento, forma da folha, altura de planta, cor da antera, posição do estigma, presença de manchas na corola, constrição anelar no cálice, cor do fruto maduro, forma do fruto, forma do ápice do fruto, superfície do fruto, presença de pungência, dias para florescimento, massa fresca, largura e comprimento de fruto. Foi verificado que dentre os 40 acessos, 85% pertenciam à espécie *C. chinense*, 10% apresentaram características tanto de *C. annuum* como de *C. frutescens*, e dois acessos foram identificados como *C. baccatum*. Análises multivariadas de Componentes Principais (PCA), Agrupamentos e Coordenadas Principais (PcoA), foram realizadas verificando-se a existência de variabilidade entre os acessos. O coeficiente de dissimilaridade variou de 0,015 a 0,818. A análise de agrupamentos resultou na formação de cinco grupos que separaram os acessos principalmente quanto ao formato e tamanho do fruto. Com base na análise da diversidade três acessos de *C. chinense* com características morfológicas divergentes, foram selecionados como genitores para a estimativa da taxa de cruzamento natural. Os três acessos foram dispostos em módulos contendo uma planta de cada genótipo e deixados a campo para a ocorrência de cruzamentos naturais. Hibridações artificiais foram feitas entre os acessos selecionados a fim de se obter híbridos para utilização como testemunhas na avaliação da ocorrência e direção dos cruzamentos por meio da observação da expressão de marcadores morfológicos. A taxa de cruzamento variou de 0% a 40,6%, indicando que a espécie *C. chinense* apresenta sistema reprodutivo misto cujas taxas variaram principalmente em função do genótipo.

Palavras-chave: Pimenta; Variabilidade genética; Caracterização; Marcadores morfológicos; Sistema reprodutivo

ABSTRACT

Morpho-agronomic diversity and natural outcrossing rate in peppers *Capsicum chinense*

Studies on the diversity and reproductive system of crop plants are important for plant breeding programs as well as for the conservation and use of genetic resources. This work is composed of two stages: the first stage aimed to characterize 40 accessions of pepper (*Capsicum* spp.) from the germplasm bank of the Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo, with morpho-agronomic traits, and generating information that subsidized the methodology of the second stage, estimating the natural outcrossing rate of this species. The characterization was carried out for 16 traits, with high diversity being observed for the traits of plant growth habit, leaf shape, plant height, anther color, stigma exertion, presence of spots on corolla, calyx annular constriction, fruit color at mature stage, fruit shape, fruit apex shape, fruit surface, presence of pungency, days to flowering, weight, width and length of the fruit. Among the 40 accessions, 85% belonged to the species *C. chinense*, while 10% showed characteristic of both *C. annuum* and *C. frutescens*, and two accessions were identified as *C. baccatum*. Principal Components multivariate analyses (PCA), cluster and Principal Coordinates analyses (PcoA) were performed showing the existence of variability between the accessions. The dissimilarity coefficient ranged from 0.015 to 0.818. The cluster analysis resulted in the formation of five groups of accessions that diverged mainly according to size and shape of the fruit. Based on the diversity analysis, three morphologically distinct accessions of *C. chinense* were selected as parents for estimating the natural outcrossing rate. The three accessions were arranged in modules containing one plant of each genotype and were left in the field for the occurrence of natural crosses. Artificial hybridizations were made between the selected accessions in order to obtain hybrids for use as testers in the evaluation of the occurrence and direction of crosses by observing the expression of the morphological markers. The outcrossing rates varied from 0% to 40.6%, indicating that *C. chinense* presents a mixed reproductive system, and that the outcrossing rates varied mainly due to the genotype.

Keywords: Pepper; Genetic variability; Characterization; Morphological markers; Mating system

1. INTRODUÇÃO

As pimentas pertencentes ao gênero *Capsicum*, família Solanaceae, foram uma das primeiras plantas a serem domesticadas nas Américas, tendo sido utilizadas pela humanidade há mais de 6000 anos, conforme registros encontrados no México, Peru, Bolívia (Perry e Flannery 2007, Kraft *et al.* 2014). O gênero é originário da América Tropical, e desde a época das grandes navegações, seu consumo tem se popularizado e se incorporado na cultura de povos de outras partes do mundo (Barbieri e Neitzke 2008). O cultivo atual se estende mundialmente, com destaque para a China, México e Turquia, como os maiores produtores (FAO 2018). No Brasil, cultivam-se pimentas em praticamente todos os estados, sendo uma atividade tipicamente familiar de grande importância social e econômica, pois atua como fonte de renda e na absorção de mão-de-obra (Pereira *et al.* 2014).

O gênero *Capsicum* compreende as hortaliças denominadas como pimentas e pimentões, e é composto por aproximadamente 35 espécies descritas, das quais cinco foram domesticadas e são amplamente cultivadas (*C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* (Willd.) Eshbaugh, e *C. pubescens* Ruiz et Pav.) (Moscone *et al.* 2007, Pickersgill 2007, Carrizo García *et al.* 2016). Dentre as características envolvidas na domesticação das pimentas destacam-se a perda do mecanismo de dispersão; o aumento de tamanho de frutos, folhas, flores e sementes quando comparadas às variedades selvagens; e o aumento da variabilidade morfológica (Pickersgill 2007, Luna-Ruiz *et al.* 2018). Os frutos vermelhos pequenos, eretos e decíduos foram substituídos por frutos maiores geralmente pendentes, que permanecem firmemente aderidos à planta e com uma ampla variedade de cores além da vermelha (Andrews 1995, Barbieri e Neitzke 2008). Aparentemente, a domesticação resultou também em uma mudança no modo de reprodução, passando de fecundação cruzada para autofecundação (Andrews 1995, Barbieri e Neitzke 2008, Luna-Ruiz *et al.* 2018). O gênero é bem diverso apresentando alta variabilidade morfológica, tanto interespecífica como intraespecífica, sendo indicativo de existência de grande variabilidade genética. A diversidade no grupo das pimentas é observada, principalmente, nas diferentes formas, cores e atributos sensoriais de seus frutos, a qual permite uma versatilidade de aplicações seja culinária, industrial, farmacêutica, bélica (“spray de pimenta”) e ornamental (Bosland 1996, Barbieri e Neitzke 2008).

O Brasil é considerado um importante centro de diversidade de pimentas, sendo encontrado grande número de espécies domesticadas, semidomesticadas e selvagens (Moscone *et al.* 2007). Dentre as espécies domesticadas, destaca-se no país a *C. chinense*, que é bem adaptada a ambientes quentes e úmidos, sendo facilmente encontrada na região amazônica, onde provavelmente seria seu centro de domesticação (Heiser Jr. 1976, Pickersgill 2007). Seu cultivo, assim como as demais espécies de pimentas, geralmente ocorre em pequenas propriedades, sendo comercializada in natura ou em conservas em mercados e feiras livres. Os frutos de *C. chinense* apresentam um aroma forte e característico, além de diferentes formatos, tamanho, coloração e níveis de pungência.

O conhecimento sobre os acessos disponíveis em bancos de germoplasma é essencial para a conservação de recursos genéticos vegetais bem como para a busca de variabilidade em programas de melhoramento genético. Diversas coleções de germoplasma de *Capsicum* têm sido caracterizadas por meio de descritores morfoagronômicos, marcadores moleculares e análises citogenéticas (Lannes *et al.* 2007, Domenico *et al.* 2012, Baba *et al.* 2015, Fonseca 2016, Martins *et al.* 2018, Moreira *et al.* 2018). A caracterização e a avaliação são etapas fundamentais para um melhor conhecimento da diversidade disponível, discriminação de acessos e identificação de duplicatas, além de permitirem a identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos (Valls 2007). Segundo Pickersgill (1997), as pimentas apresentam alta variabilidade que ainda permanece pouco estudada e explorada, e que esta diversidade deveria ser relativamente fácil de ser utilizada.

As pimentas domesticadas possuem flores completas, autocompatíveis e são consideradas autógamias (Allard 1971), com taxas de polinização cruzada que podem variar de 2% a 90%, dependendo da variedade, ambiente, morfologia e presença de agentes polinizadores (Odland e Porter 1941, Campodonico 1983, Tanksley 1984, Justino *et al.* 2018). Estas elevadas taxas de cruzamento podem resultar na ocorrência de segregação durante a multiplicação e regeneração de acessos de germoplasma na produção comercial, sendo necessário tomar precauções para manter a pureza genética de acessos e durante a condução de programas de melhoramento de pimentas (Bosland 1993, Rêgo *et al.* 2011). Alguns mecanismos que favorecem a alogamia, tais como a protoginia, macho-esterilidade e estigma posicionado acima das anteras foram estudados e observados em alguns trabalhos com *Capsicum* (Shifriss 1997, Aleemullah *et al.* 2000, Cauch *et al.* 2006, Luz 2007, Cruz e Campos 2008, Crispim *et al.* 2017). Entretanto, há poucas pesquisas referentes à determinação da taxa de cruzamento, especialmente para *C. chinense*. O conhecimento do sistema reprodutivo de uma espécie é de essencial importância para os melhoristas, uma vez que tal informação pode auxiliar na elaboração de estratégias para a condução do melhoramento genético.

A demanda por pimentas e produtos à base de pimentas tem aumentado significativamente, destacando-se como um dos condimentos mais vendidos no mundo (Rufino e Penteadó 2006, Ribeiro *et al.* 2008). As pimentas tem se mostrado um produto interessante a ser explorado no Brasil, cuja exploração dos recursos genéticos possibilita o lançamento de novos produtos no mercado com qualidades antes desconhecidas, contribuindo para o desenvolvimento sustentável da agricultura e da agroindústria (Neitzke 2012). Além disso, há a demanda por novos cultivares que visam atender não somente as necessidades dos produtores, quanto à tolerância a estresses abióticos e bióticos, como também ao mercado consumidor, em que os aspectos qualitativos possuem um grande peso em função da forma de utilização (fruto fresco, processado, fruto seco, para extração de oleoresina e ornamental).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho caracterizar morfoagronomicamente 40 acessos de pimenta pertencentes ao banco de germoplasma da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (USP/ESALQ), cujas informações foram utilizadas para a tomada de decisão quanto à metodologia para a avaliação e determinação da taxa de cruzamento natural para acessos da espécie *C. chinense*.

REFERÊNCIAS

- Aleemullah M, Haigh AM e Holford P (2000) Anthesis, anther dehiscence, pistil receptivity and fruit development in the Longum group of *Capsicum annuum*. **Australian Journal of Experimental Agriculture** **40**: 755–762.
- Allard RW (1971) **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Edgard Blucher, São Paulo, 381p.
- Andrews J (1995) **Peppers: the domesticated *Capsicum***. University of Texas Press, Austin, 186p.
- Baba VY, Rocha KR, Gomes GP, de Fátima Ruas C, Ruas PM, Rodrigues R e Gonçalves LSA (2015) Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution** **63**: 1371–1381.
- Barbieri RL e Neitzke RS (2008) Pimentas do gênero *Capsicum*. EMBRAPA, Brasília, DF, p. 729–745. In Barbieri RL e Stumpf ERT (orgs) **Origem e evolução de plantas cultivadas**.
- Bosland PW (1993) An effective plant field cage to increase the production of genetically pure Chile (*Capsicum* spp.) seed. **HortScience** **28**: 1053.
- Bosland PW (1996) *Capsicums*: Innovative Uses of an Ancient Crop. ASHS Press, Arlington, VA, p. 479–487. In Janick J (org) **Progress in new crops**.
- Campodonico OP (1983) Estimates of natural cross-pollination in Serrano pepper (*Capsicum annuum* L.). Turin, Italy, p. 113–115. In **Capsicum Newsletter** **2**.
- Carrizo García C, Barfuss MHJ, Sehr EM, Barboza GE, Samuel R, Moscone EA e Ehrendorfer F (2016) Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). **Annals of Botany** **118**: 35–51.
- Cauch O, Quezada Euán JJG, Ramírez VM, Valdovinos-Nuñez GR e Moo-Valle H (2006) Pollination of habanero pepper (*Capsicum chinense*) and production in enclosures using the stingless bee *Nannotrigona perilampoides*. **Journal of Apicultural Research** **45**: 125–130.
- Crispim JG, Rêgo ER, Rêgo MM, Nascimento NFF, Barroso PA, Crispim JG, Rêgo ER, Rêgo MM, Nascimento NFF e Barroso PA (2017) Stigma receptivity and anther dehiscence in ornamental pepper. **Horticultura Brasileira** **35**: 609–612.
- Cruz DDO e Campos LADO (2008) Biologia floral e polinização de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L., Solanaceae): um estudo de caso. **Acta Scientiarum. Biological Sciences** **29**: 375–379.
- Domenico CI, Coutinho JP, Godoy HT e Melo AM (2012) Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. **Horticultura Brasileira** **30**: 466–472.
- FAO (2018) FAOSTAT Database. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity> Acessado 10 de setembro de 2018.
- Fonseca RM (2016) Caracterização morfoagronômica de gerações de *Capsicum annuum* x *Capsicum chinense*. Universidade Federal do Amazonas Faculdade de Ciências Agrárias, 142p.
- Heiser Jr. CB (1976) Peppers *Capsicum* (Solanaceae). Longman, London, p. 265–268. In Simmond NW (org) **Evolution of crop plants**.
- Justino E, Fonseca M, Ferreira M, Boiteux L, Silva P e Nascimento W (2018) Estimate of natural cross-pollination rate of *Capsicum annuum* using a codominant molecular marker associated with fruit pungency. **Genetics & Molecular Research** **17**: 1–9.
- Kraft KH, Brown CH, Nabhan GP, Luedeling E, Luna Ruiz J de J, Coppens d'Eeckenbrugge G, Hijmans RJ e Gepts P (2014) Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **111**: 6165–6170.

- Lannes SD, Finger FL, Schuelter AR e Casali VWD (2007) Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae** **112**: 266–270.
- Luna-Ruiz J de J, Nabhan GP e Aguilar-Meléndez A (2018) Shifts in plant chemical defenses of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) due to domestication in Mesoamerica. **Frontiers in Ecology and Evolution** **6**: 1–12.
- Luz FJ de F (2007) Caracterizações morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.). Universidade Estadual Paulista, 70p.
- Martins KC, Souza SAM, Pereira TNS, Rodrigues R, Pereira MG e Cunha M da (2018) Caracterização palinológica e divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. **Horticultura Brasileira** **31**.
- Moreira AFP, Ruas PM, Ruas C de F, Baba VY, Giordani W, Arruda IM, Rodrigues R e Gonçalves LSA (2018) Genetic diversity, population structure and genetic parameters of fruit traits in *Capsicum chinense*. **Scientia Horticulturae** **236**: 1–9.
- Moscone EA, Scaldaferrero MA, Grabiele M, Cecchini NM, Sánchez García Y, Jarret R, Daviña JR, Ducasse DA, Barboza GE e Ehrendorfer F (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* - solanaceae): a cytogenetic perspective. **Acta Horticulturae** **745**: 137–170.
- Neitzke RS (2012) Recursos genéticos de pimentas do gênero *Capsicum* - explorando a multiplicidade de usos. Universidade Federal de Pelotas.
- Odland ML e Porter AM (1941) A study of natural crossing in peppers (*Capsicum frutescens*). **American Society for Horticultural Science** 585–588.
- Pereira R de CA, Crisóstomo JR, Rosseti AG e Santos OG dos (2014) Avaliação de progênes de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L) no Ceará. **Horticultura Brasileira** **31**: 1479–1486.
- Perry L e Flannery K V (2007) Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **104**: 11905–9.
- Pickersgill B (2007) Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany** **100**: 925–940.
- Pickersgill B (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica** **96**: 129–133.
- Rêgo ER, Finger FL, Bolsista NFN, Araújo ER e Sapucay MJLC (2011) Genética e melhoramento de pimenteiros *Capsicum* spp. Imprima, Recife, p. 117–135. In Rêgo ER, Finger FL, e Rêgo MM (orgs) **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp.)**.
- Ribeiro CSC, Carvalho SIC., Lopes CA. e Reifschneider FJB (2008) **Pimentas *Capsicum***, 1º ed. EMBRAPA, Brasília, DF, 200p.
- Rufino JL dos S e Penteadó DCS (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário** **27**: 7–15.
- Shifriss C (1997) Male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Euphytica** **93**: 83–88.
- Tanksley SD (1984) High rates of cross-pollination in chile pepper. **HortScience (USA)** **19**: 580–582.
- Valls JFM (2007) Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. EMBRAPA, Brasília, DF, p. 281–305. In Nass LL (org) **Recursos Genéticos Vegetais**.

2. DIVERSIDADE MORFOAGRONÔMICA DE PIMENTAS *Capsicum chinense*

RESUMO

A caracterização de acessos consiste em uma das etapas iniciais para o conhecimento do banco de germoplasma, importante para a manutenção da diversidade e para uso em programas de melhoramento genético. As pimentas do gênero *Capsicum* apresentam grande variabilidade morfológica. Neste trabalho 40 acessos de pimenta do banco de germoplasma da ESALQ/USP foram caracterizados para 16 descritores recomendados pelo IPGRI, entre caracteres qualitativos (12) e quantitativos (4). Para a análise de agrupamentos utilizaram-se o algoritmo de Gower e o método aglomerativo hierárquico das médias das distâncias UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average). De modo complementar, foram realizadas a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para a representação gráfica da similaridade, e a Análise de Componentes Principais (PCA) para as variáveis quantitativas. Foi verificado em campo que 85% dos acessos pertenciam à espécie *C. chinense*, 10% apresentaram tanto características de *C. annuum* e *C. frutescens*, e dois acessos foram identificados como *C. baccatum*. Grande variabilidade fenotípica foi encontrada entre os acessos, os quais puderam ser classificados em cinco grupos, separando-se principalmente quanto aos caracteres do fruto (superfície, forma, comprimento, largura e massa fresca). O coeficiente de dissimilaridade variou de 0,015 a 0,818. O acesso mais divergente (USP-CB10) pertence à espécie *C. baccatum*. Entre os acessos de *C. chinense*, a maior distância genética estimada foi entre os acessos USP-CC12 e USP-CC37 com coeficiente de dissimilaridade de 0,708.

Palavras-chave: *Capsicum* spp.; Banco de germoplasma; Caracterização morfoagronômica; Recursos genéticos

ABSTRACT

Characterization of accessions consists of one of the first stages to acquire knowledge of the germplasm bank, which is important for the management of genetic diversity and for plant breeding programs. The peppers of the genus *Capsicum* present great morphological variability. In this study, 40 accessions of pepper from the ESALQ / USP germplasm bank were characterized for 16 descriptors recommended by IPGRI, being 12 qualitative and four quantitative. Cluster analysis was performed using the Gower algorithm and the hierarchical agglomerative method UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average). In addition, the Principal Coordinate Analysis (PCoA) for the graphical representation of similarity, and the Principal Components Analysis for the quantitative traits were performed. Field observations showed that 85% of the accessions belonged to the species *C. chinense*, 10% presented characteristics of both *C. annuum* and *C. frutescens*, and two accessions were identified as *C. baccatum*. Large phenotypic variability was found among the accessions, which were classified into five groups, mainly due to fruit characters (surface, shape, length, width and weight). The dissimilarity coefficient ranged from 0.015 to 0.818. The most divergent accession (USP-CB10) belonged to the species *C. baccatum*. Within *C. chinense* accessions, the highest genetic distance was estimated between the accessions USP-CC12 and USP-CC37, with dissimilarity coefficient of 0.708.

Keywords: *Capsicum* spp.; Germplasm bank; Morpho-agronomic characterization; Genetic resources

2.1. INTRODUÇÃO

As pimentas e pimentões correspondem a uma das hortaliças, pertencentes à família Solanaceae mais importantes mundialmente, juntamente com o tomate, batata e berinjela. As pimentas do gênero *Capsicum* são cultivadas há milhares de anos, sendo originárias das Américas Central e Sul (Pickersgill 1997, 2007). Desde a sua descoberta pelos europeus e sua introdução nos demais continentes, esta hortaliça tem se destacado como um importante condimento, sendo facilmente aceita pelos diversos povos e culturas. Atualmente, o mercado das pimentas é bem diversificado, com uma grande variedade de usos e aplicações, podendo ser consumidas in natura, na forma processada e ou como planta ornamental, além de ser utilizada pelas indústrias farmacêutica e cosmética (Neitzke *et al.* 2016). Essa versatilidade de aplicações tem contribuído para o aumento da produção desta cultura.

O gênero *Capsicum* é um grupo bem diverso composto por 35 espécies, entre domesticadas (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*), semidomesticadas e selvagens (Moscone *et al.* 2007, Carrizo García *et al.* 2016). O gênero se caracteriza pela capacidade de produção de capsaicinoides o qual confere o sabor picante dos frutos, além da grande variação morfológica, facilmente observada pelos diferentes formatos, cores, tamanhos e sabor dos frutos de pimenta. Tal variabilidade, entretanto, ainda permanece pouco estudada e explorada, com pouca informação científica sobre a variabilidade existente entre acessos da mesma espécie, evidenciada pela escassez de cultivares melhoradas (Pickersgill 1997, Sudré *et al.* 2010, Domenico *et al.* 2012, Bianchi *et al.* 2016).

O Brasil é considerado um importante centro de diversidade, merecendo destaque a espécie *C. chinense*, a qual é a mais adaptada ao clima quente e úmido e cujo provável centro de domesticação se localiza nas terras baixas da Bacia Amazônica (Pickersgill 2007). Os frutos desta espécie apresentam um aroma forte e característico, além de grande diversidade morfológica. Devido a essa diversidade, inúmeras denominações populares são atribuídas, tais como ‘Pimenta-de-cheiro’, ‘Pimenta-de-bode’, ‘Cumari-do-Pará’, ‘Murupi’, ‘Habanero’, ‘Biquinho’, ‘Bhut Jolokia’, entre outros (Barbieri e Neitzke 2008, Baba *et al.* 2015). Esses grupos varietais ou morfotipos são discriminados conforme as características dos frutos que podem ser esféricos a alongados, de coloração variada, e níveis de pungência que podem variar de 0 (zero) (frutos doces) a mais de 1.000.000 (altamente pungentes) unidades Scoville (SHU) (Bosland e Baral 2007). Apesar da grande expressividade desta espécie no Brasil, Moreira *et al.* (2018) ressaltam que estudos genéticos para esta espécie ainda são escassos, uma vez que a maioria dos estudos é focada em *C. annuum*.

Para fins de melhoramento genético, o conhecimento sobre a diversidade existente nos bancos de germoplasma é de essencial importância para a sua utilização. A caracterização morfoagronômica consiste em uma das primeiras etapas para se conhecer a diversidade genética disponível nos bancos de germoplasmas, sendo de grande importância para uma melhor exploração e conservação dos recursos genéticos, além de ser fundamental na definição das estratégias para o uso em programas de melhoramento (Valls 2007). Um germoplasma pode ser submetido a diversos níveis de caracterização: morfológica, agrônômica, molecular, bioquímica, citogenética, palinológica (Martins *et al.* 2018). Todas as metodologias de caracterização são complementares no fornecimento de informações sobre a cultura.

Entretanto, Sudré *et al.* (2010) ressaltam que o conhecimento do fenótipo dado pelos descritores morfológicos e agronômicos ainda são importantes.

A importância e a eficiência da caracterização morfoagronômica na estimativa da variabilidade genética e na discriminação de acessos, bem como na identificação de genótipos potenciais para uso imediato ou em programas de melhoramento tem sido enfatizada em diversos trabalhos envolvendo as pimentas (Fonseca *et al.* 2008, Jarret e Berke 2008, Domenico *et al.* 2012, Bharath *et al.* 2013, Vasconcelos *et al.* 2014, Baba *et al.* 2015, Araújo *et al.* 2018), nos quais grande variabilidade é encontrada. Além disso, a diversidade genética de pimentas pode ser utilizada como forma de diversificação da produção, como alternativa ao monocultivo, em que o aparecimento de pragas e doenças pode inviabilizar o cultivo em uma região (Villela *et al.* 2018)..

No presente trabalho, 40 acessos de pimentas *Capsicum* spp. do banco de germoplasma da Universidade de São Paulo ESALQ/USP foram avaliados quanto à diversidade genética de caracteres morfoagronômicos, de modo a subsidiar estudos futuros para programas de melhoramento da espécie.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material avaliado

Foram caracterizados 40 acessos de pimentas previamente identificados como *C. chinense*, sendo 24 cedidos da coleção de pimentas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e 16 pertencentes ao banco de germoplasma da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (USP/ESALQ) (Tabela 1).

2.2.2. Local e condução do experimento

O experimento foi conduzido no município de Piracicaba/SP em área experimental do campus da ESALQ/USP (latitude 22° 42' S, longitude 47° 38' W e altitude 546 m), classificação climática de Köppen Cwa. Os acessos foram semeados em outubro de 2016 em bandejas de poliestireno de 128 células e foram mantidos em casa de vegetação para o desenvolvimento das mudas, as quais receberam adubações (NPK 20-20-20 e micronutriente) duas vezes por semana. As mudas foram transplantadas no local definitivo 45 dias após a semeadura, com espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1,5 m entre linhas. Os acessos foram delineados em parcelas únicas, compostas por 10 a 30 plantas. Previamente ao transplante, foi feita a calagem em área total e a adubação com NPK (4-14-8) nos sulcos de plantio, na dosagem de 25 kg/ha. Quatro adubações de cobertura com nitrogênio foram feitas durante o ciclo, na dosagem de 15 g de ureia (45% N) por planta. Os demais tratamentos culturais (controle de pragas, doenças e plantas daninhas) foram realizados conforme a recomendação para a cultura com realização de irrigação por aspersão nos períodos de estiagem.

Tabela 1. Acessos identificados como *Capsicum chinense*, incluindo o código de acesso no banco de germoplasma da ESALQ/USP, no banco do IAC e nome popular.

Acesso	Correspondência IAC	Denominação popular ou morfotipo
USP-CC01	IAC-905	Murupi
USP-CC02	IAC-998	Pimenta
USP-CC03	IAC-1248	Scoth Bonnet
USP-CC04	IAC-1416	Murupi
USP-CC05	IAC-1526	PI 152225
USP-CC06	IAC-1549	Fidalga
USP-CC07	IAC-1552	Murupi
USP-CC08	IAC-1580	Olho de Peixe
USP-CC09	IAC-1589	PI 159236
USP-CB10	IAC-1590	Panca
USP-CC11	IAC-1592	Hortivale-2
USP-CC12	IAC-1593	Fidalga
USP-CC13	IAC-1595	PI 159236
USP-CC14	IAC-1597	Ituiutaba-3
USP-CC15	IAC-1598	Ituiutaba-1
USP-CC16	IAC-1625	Naga Morich
USP-CC17	IAC-1626	Naga
USP-CC18	IAC-1628	Bhut Chocolate
USP-CC19	IAC-1629	Bhut
USP-CC20	IAC-1630	Mem
USP-CC21	IAC-1631	Bih
USP-CC22	IAC-1632	Kharika
USP-CC23	IAC-1633	Red Savina
USP-CC24	IAC-1642	Habanero
USP-CC25	-	Pimenta de Bode
USP-CC27	-	Limon
USP-CC28	-	Habanero Orange
USP-CB34	-	Pimenta de Bode 'Cacho Vermelha'
USP-CC35	-	Biquinho
USP-CC36	-	Cheiro de Luna
USP-CC37	-	Biquinho Airetama
USP-CC38	-	Biquinho
USP-CC39	-	Bode Amarela
USP-CC40	-	Habanero Chocolate
USP-CC41	-	Cheiro do Norte
USP-CC42	-	Cumari do Pará
USP-CC43	-	Murupi
USP-CC44	-	Piã
USP-CC46	-	Habanero Red
USP-CC47	-	Habanero

2.2.3. Caracterização morfoagronômica:

A avaliação morfoagronômica foi baseada na lista de descritores recomendados pelo International Plant Genetic Resource Institute, para o gênero *Capsicum* (IPGRI 1995). Foram avaliados ao todo 16 caracteres, sendo 12 qualitativos e quatro quantitativos (Tabela 2). Por ocasião do florescimento foram avaliadas as características: presença de manchas na base dos lobos da corola, cor da antera, posição do estigma em relação às anteras e dias para florescimento; no início da maturação dos frutos foram avaliados: o hábito de crescimento, o formato da folha e altura da planta, quando todas as plantas possuíam frutos maduros (145 dias após a semeadura); os frutos maduros foram avaliados quanto à

coloração, formato, superfície, forma do ápice do fruto, presença de constrição anelar entre o cálice e pedicelo, presença de pungência (análise sensorial), comprimento (cm), largura (cm) e massa fresca (g).

Tabela 2. Descritores morfoagronômicos utilizados na caracterização dos 40 acessos de *Capsicum* spp.

Descritores qualitativos	Categorias
1) Hábito de crescimento	3-Prostado; 5-Intermediário (compacto); 7-Ereto; 9-Outro
2) Forma da folha	1-Deltóide; 2-Ovalada; 3-Lanceolada
3) Altura da planta	1-Muito baixa(<25 cm); 2-Baixa (25-45 cm); 3-Média (46-65 cm); 4-Alta(66-85 cm); 5- Muito alta(>85 cm)
4) Cor da antera	1-Branco; 2-Amarelo; 3-Azul pálido; 4-Azul; 5-Roxo; 6-Outro
5) Posição do estigma em relação às anteras	3-Inserido; 5-Mesmo nível; 7-Acima
6) Presença de manchas na corola	0-Ausente; 1-Presente
7) Presença de constrição anelar no cálice	0-Ausente; 1-Presente
8) Cor do fruto maduro	1-Branco; 2-Amarelo; 3-Amarelo-laranja pálido; 4-Amarelo-laranja; 5-Salmão; 6-Laranja; 7-Vermelho claro; 8-Vermelho; 9-Vermelho escuro; 10-Roxo; 11-Marrom; 12-Preto; 13-Amarelo-limão; 14-Outro
9) Forma do fruto	1-Alongado; 2-Arredondado; 3-Triangular; 4-Campanulado; 5-Retangular; 6-Outro
10) Superfície do fruto	1-Lisa; 2-Semienrugada; 3-Enrugada; 4-Rugosa; 5-Outro
11) Forma do ápice do fruto	1-Pontiagudo; 2-Arredondado; 3-Afundado; 4-Afundado e pontiagudo
12) Presença de pungência	0-Ausente; 1-Presente
Descritores quantitativos	
13) Dias para floração (dias após semeadura)	Número de dias após semeadura em que 50% das plantas possuem uma flor por nó
14) Comprimento do fruto (cm)	Média de 30 frutos
15) Largura do fruto (cm)	Média de 30 frutos
16) Massa fresca do fruto (g)	Média de 30 frutos

2.2.4. Análise Estatística:

Todos os dados obtidos nesse estudo foram analisados utilizando o programa estatístico “R” (R Core Team 2018). Foram realizadas análises de estatística descritiva para todos os caracteres morfológicos, considerando a moda (categoria mais frequente) de cada acesso. Na análise de diversidade genética foram aplicados procedimentos estatísticos multivariados. Para a estimativa da dissimilaridade entre os acessos utilizou-se o algoritmo de Gower, cujo coeficiente de similaridade permite o cálculo de uma medida de dissimilaridade única considerando os diferentes tipos de variáveis categóricas, binárias e quantitativas. Os 40 acessos foram agrupados utilizando o método aglomerativo hierárquico UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e a Análise de Coordenadas Principais (PCoA). As variáveis quantitativas de comprimento, largura e massa fresca de frutos, foram submetidas ao teste de comparação de médias de Scott-Knott (5% de significância) e à Análise de Componentes Principais (PCA).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Análise descritiva

Dentre os 40 acessos caracterizados foram observados em campo que seis acessos não possuíam constrição anelar no cálice, sendo, portanto, não pertencentes à espécie *C. chinense*, uma vez que tal característica é intrínseca desta espécie e utilizada em chaves taxonômicas para a diferenciação das espécies domesticadas do gênero *Capsicum*. Dois acessos foram classificados como pertencentes à espécie *C. baccatum* var. *pendulum* (USP-CB010 e USP-CB034), por apresentarem uma flor por nó e flores brancas com presença de manchas amarelas nas pétalas e anteras amarelas (Carvalho *et al.* 2006). Os demais acessos sem constrição no cálice (USP-CC17, USP-CC20, USP-CC22 e USP-CC25), podem tanto pertencer às espécies *C. annuum* como *C. frutescens*, entretanto, a correta classificação taxonômica não pôde ser verificada somente pelo critério morfológico.

As espécies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e a espécie selvagem *C. galapagoense* compõem o complexo *annuum*, devido à alta similaridade morfológica e proximidade genética (Carvalho *et al.* 2014). Segundo Pickersgill (1977), as três espécies domesticadas (*C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*) surgiram a partir de diferentes partes do mesmo complexo incompletamente diferenciado de formas selvagens, sendo a identificação taxonômica dentro de um complexo pertencente ao mesmo pool gênico complicada devido à sobreposição morfológica e compatibilidade sexual parcial (Pickersgill 1991). Nas três espécies a cor da corola varia de branco a amarelo esverdeado e as anteras de púrpura a violeta. A principal característica diferenciadora entre *C. frutescens* e *C. annuum* é o número de flores por nó, entretanto, as chaves de classificação não são totalmente restritivas quanto a esta característica, podendo ambas as espécies apresentarem uma ou mais flores por nó (Nuez Viñals *et al.* 1996, Ribeiro *et al.* 2008). De maneira geral, a espécie *C. annuum* apresenta uma flor por inflorescência, raramente duas ou mais, grande diversidade morfológica de frutos, pendentes e persistentes. Entretanto, formas selvagens de *C. annuum*, como a variedade local Chiltepin (*C. annuum* var. *glabriusculum*), podem apresentar inserção do pedicelo ereto, frutos pequenos, vermelhos ou roxo escuros quando maduros, de formato ovoide a fusiformes, geralmente decíduos, com diâmetro entre 5 mm e 15 mm (Carvalho *et al.* 2006, Hayano-Kanashiro *et al.* 2016). Estas últimas características se assemelham às características geralmente apresentadas por *C. frutescens*, a qual geralmente apresenta inserção do pedicelo ereto, frutos pequenos, cônicos, pungentes, com parede delgada e coloração vermelha quando maduros. Em relação à espécie *C. chinense*, esta geralmente apresenta mais de uma flor por axila, constrição anelar no cálice, e inserção da flor pendente. Entretanto, a existência de acessos com uma ou poucas características morfológicas diagnósticas de uma espécie e o restante das outras características de outras espécies torna difícil a classificação das espécies (Baral e Bosland 2004), de modo que outra técnica como teste de cruzamento, análise citogenética e/ou molecular seriam necessárias para auxiliar na correta identificação botânica.

Grande variabilidade foi observada para os demais caracteres morfoagronômicos considerados (Apêndice A). Cinco categorias de hábito de crescimento foram observadas, sendo a maioria (52,2%) com

hábito intermediário e grande variação na altura de planta (valores entre 39,1 e 85,6 cm), seguido de hábito ereto (17,5%), em que se predominou plantas altas (72,5 a 90,4 cm), levemente ereto (15%) (altura entre 58,7 e 83,0 cm), hábito prostrado (10%), (altura entre 32,0 e 36,9 cm), e apenas dois acessos (5%) (USP-CC36 e USP-CC42) classificados como levemente prostrados, com 53,2 e 54,9 cm de altura. Para o formato da folha as três categorias determinadas pelo IPGRI (1995) foram observadas, sendo que 47,5% apresentaram folhas ovais, 40% deltoides e 12,5% folhas lanceoladas.

As flores apresentaram anteras de coloração amarela (10%), azul pálido (10%), e azul e roxo (80%). Muitos autores consideram a coloração da antera como uma característica discriminante da espécie, entretanto, anteras amarelas em *C. chinense*, apesar de menos frequentes, foram reportados por Smith e Heiser (1957) na descrição da espécie. Os dois acessos pertencentes à espécie *C. baccatum*, USP-CB10 e USP-CB34 apresentam essencialmente anteras amarelas. A posição do estigma foi classificada de acordo com a comparação em relação ao tamanho dos estames, sendo que a maioria dos acessos (67,5%) apresentou estigmas acima ou levemente acima do nível das anteras. Por outro lado, 20% dos acessos encontravam-se no mesmo nível, enquanto 12,5% encontravam-se inseridos. A maior frequência de observações de estigmas acima do nível das anteras em acessos de pimentas também foi observada por Fonseca *et al.* (2008), Vasconcelos *et al.* (2012) e Padilha *et al.* (2016). Tal característica pode influenciar a taxa de polinização cruzada, uma vez que estigmas excertos são mais propensos ao aumento da taxa de polinização por insetos (Tanksley 1984). A ocorrência de cruzamentos muitas vezes é indesejada principalmente quando se deseja a manutenção da pureza genética de um determinado cultivar ou acesso.

No presente trabalho, foram observados em campo 10 acessos que apresentaram segregação para um ou mais caracteres, tais como coloração das anteras, formato e coloração de frutos e pungência (Figura 1). A presença de plantas atípicas pode ser causada tanto pela contaminação mecânica de sementes ou pela fecundação não controlada durante ciclos anteriores de multiplicação de acessos. Em vários estudos envolvendo a caracterização morfoagronômica, foram observados a ocorrência de segregação dentro de um mesmo acesso (Rêgo *et al.* 2011), visto que taxas variáveis de polinização cruzada entre 2 e 90% podem ocorrer no gênero *Capsicum* (Odland e Porter 1941, Campodonico 1983, Tanksley 1984, Justino *et al.* 2018), evidenciando assim a necessidade de manejo da planta para garantir a autofecundação e, conseqüentemente, a manutenção da pureza genética dos acessos.



Figura 1. Acessos USP-CC04 e USP-CC14 segregando para caracteres de cor e forma de frutos.

O tempo para florescimento é uma importante característica a ser considerada nos programas de melhoramento, pois além desta informação ser necessária para a recomendação de cultivares conforme o ciclo (precoce e tardios) e sistema de cultivo, a sincronia dos períodos de florescimento é desejável quando se objetiva a realização de cruzamentos. O período de florescimento para os 40 acessos avaliados variou de 71 a 110 dias após a semeadura, sendo os acessos mais precoces USP-CC17 e USP-CC27 e os mais tardios USP-CC21 e USP-CC25 (Figura 2). Aos 93,5 dias, metade dos acessos apresentava pelo menos uma flor aberta em 50% das plantas. Tais resultados foram condizentes com Domenico *et al.* (2012) em que o número de dias para a antese da primeira flor variou entre 75 e 102 dias após a semeadura para nove acessos de *C. chinense*. Padilha e Barbieri (2016), entretanto, observaram que a maioria de seus acessos floresceu a partir de 91 dias. A variação no período de florescimento é decorrente de inúmeros processos de caráter complexo que envolve fatores genéticos e estímulos ambientais (e. g. fotoperíodo e temperatura) e endógenos (e. g. idade da planta e respostas a hormônios) (Yamamoto *et al.* 2007, Srikanth e Schmid 2011, Borovsky *et al.* 2015).

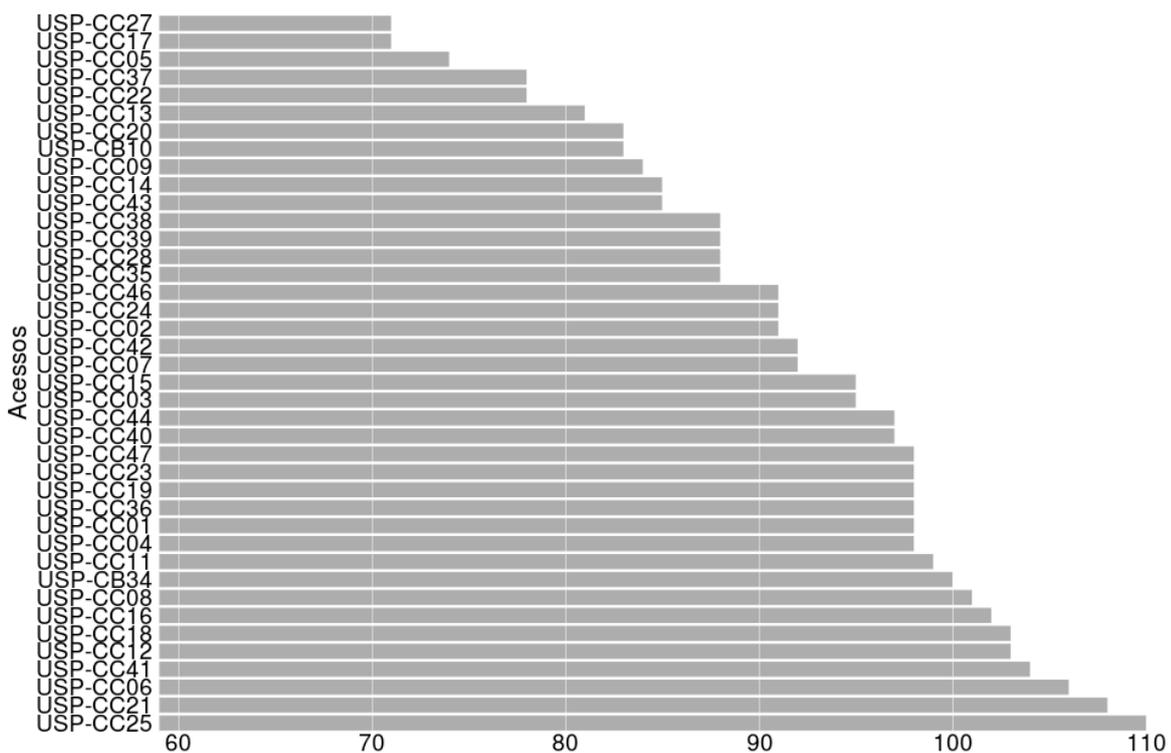


Figura 2. Tempo para florescimento para 40 acessos de *Capsicum* spp. em dias após semeadura.

Os frutos apresentaram formas e coloração variadas (Figura 6), sendo estas características comumente utilizadas na distinção dos morfotipos de pimenta (Alves 2009). As cinco categorias em relação ao formato presentes nos descritores do (IPGRI 1995) puderam ser detectadas, sendo que 42,5% dos acessos apresentaram formato alongado, 27,5% foram triangulares, 15% retangular, 10% campanulado e 5% arredondado. Em relação à coloração do fruto maduro, oito classes foram

identificadas, sendo a coloração vermelha a mais frequente (45%), seguido da coloração salmão (15%) e laranja (12%). A grande variabilidade de cores e formas de frutos dentro da espécie *C. chinense* é comumente reportada por diversos trabalhos. Alves (2009) e Fonseca *et al.* (2008) identificaram sete e nove cores de fruto em estágio maduro em 23 e 49 acessos, respectivamente, além de quatro formas diferentes de frutos. Já Bharath *et al.* (2013) encontraram 12 estados de coloração em 252 acessos avaliados e cinco classes de formato de fruto. Nestes estudos também houve grande variação no tamanho e peso de frutos.

Quanto à superfície do fruto, 45% apresentaram superfície semienrugada, 30% lisa, 15% enrugada e uma quarta categoria, denominada no presente trabalho como rugosa, foi criada para representar a presença de protuberâncias na superfície, correspondendo a 10% dos acessos. Tal característica foi definida por Bharath *et al.* (2013) como superfície protuberante ("peebbling") (Figura 3).

Em relação à presença de pungência, a maioria dos acessos (82,5%) apresentou pungência, enquanto que 17,5% foram não pungentes. Todos os acessos que se enquadram no morfotipo 'Biquinho' foram classificados como não pungentes. Entretanto, Vasconcelos *et al.* (2014) identificaram níveis variados de pungência, de baixa, média e doce, para este morfotipo. No presente estudo a classificação quanto à pungência foi realizada por meio da análise sensorial do fruto, o qual é um critério subjetivo que varia conforme o avaliador. Deste modo, é possível a existência de variação quanto aos níveis de ardência dentro de uma mesma categoria.

Quanto aos caracteres quantitativos, houve grande variabilidade nos valores médios dos frutos. O teste de Scott-Knott foi aplicado individualmente para cada variável, ao nível de 5% de significância, permitindo a obtenção de três agrupamentos diferentes com 20, 18 e 19 grupos para as variáveis de comprimento, largura e massa fresca de fruto, respectivamente (Tabela 3). O elevado número de grupos obtido evidencia a grande variabilidade existente para as características mensuradas nos frutos. O maior coeficiente de variação (24,6%) foi observado para o caráter massa fresca, enquanto que para a largura do fruto o coeficiente de variação foi de 10,1%.



Figura 3. Exemplo de fruto de *Capsicum chinense* com presença de protuberâncias na superfície (categoria rugosa).

O comprimento médio dos frutos variou de 1,26 cm (USP-CC08) a 11,08 cm (USP-CB10), com valor médio de 4,74 cm. Quanto à largura do fruto, foi observado no presente trabalho valores entre 0,68 cm (USP-CC25) e 3,78 cm (USP-CC12) e média de 2,24 cm. Tais valores estão próximos aos obtidos em relação a estudos anteriores considerando a espécie *C. chinense*. Jarret e Berke (2008), avaliando 330 acessos de *C. chinense* do banco de germoplasma do Departamento de Agricultura de Griffin, GA, Estados Unidos (USDA/ARS), encontraram uma amplitude de variação para o comprimento do fruto entre 0,79 cm e 11,37 cm (média 4,7 cm), e para largura entre 0,62 cm e 4,00 cm (média 2,17 cm). Bharath *et al.* (2013) reportaram valores de comprimento entre 0,63 cm e 7,04 cm e largura entre 0,68 cm e 4,03 cm para 264 acessos da University of the West Indies, Trinidad (UWI). Mais recentemente, Baba *et al.* (2015) observaram valores de comprimento mínimo e máximo de 1,14 cm e 9,88 cm e de largura de 0,84 cm e 3,86 cm em 71 acessos da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

A massa fresca apresentou média de 6,47 g e amplitude de 0,33 g (USP-CC25) a 30,99 g (USP-CB010). Jarret e Berke (2008), em sua coleção, a massa fresca média de frutos variou entre 0,18 g e 22,71 g. Vasconcelos *et al.* (2014), por sua vez, encontraram variação entre 1,64 g e 25,75 g em 22 acessos de *C. chinense*. Já Baba *et al.* (2015) observaram uma variação entre 0,46 g e 24,18 g nos 71 acessos avaliados. Cabe ressaltar que na presente coleção, o acesso USP-CB010, o qual pertence à *C. baccatum*, foi o que apresentou os maiores valores de massa fresca de fruto e o acesso USP-CC25, também não pertencente à espécie *C. chinense*, apresentou o menor valor médio, sendo um indicativo de existência de uma variabilidade ainda maior considerando as diferentes espécies dentro do gênero *Capsicum*.

O acesso USP-CC25 com menor massa fresca apresentou também menor largura. De modo semelhante, o acesso USP-CB10 com maior valor de massa fresca apresentou maior comprimento de fruto. Pela análise de correlação entre as três variáveis, a massa fresca de fruto apresentou valores de correlação com o comprimento e largura de $r=0,67$ e $r=0,66$, respectivamente, já as variáveis comprimento e largura tiveram menor associação ($r=0,13$). Os dois primeiros componentes, obtidos pelo método de Componentes Principais (PCA), conseguiram explicar 95,2% da variância total, sendo o primeiro componente responsável por 67,8%. A análise conjunta dessas três variáveis permitiu visualizar que o acesso USP-CB010 (nº 10) foi o mais divergente isolando-se dos demais acessos, confirmando o teste Scott-Knott o qual formou um único grupo considerando as variáveis de comprimento e massa fresca do fruto (Figura 4).

Tabela 3. Valores médios de comprimento (cm), largura (cm) e massa fresca de frutos (g) para os 40 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.).

Acesso	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Massa fresca (g)
USP-CC01	5,61 ¹ F ²	1,27 N	2,66 K
USP-CC02	8,15 C	2,33 F	11,35 B
USP-CC03	3,05 M	3,76 A	8,89 D
USP-CC04	5,08 H	2,24 G	5,47 G
USP-CC05	4,87 H	1,54 L	3,27 I
USP-CC06	3,54 K	3,56 A	9,98 C
USP-CC07	5,86 F	1,53 L	3,83 H
USP-CC08	1,26 T	1,23 N	0,88 R
USP-CC09	8,19 C	2,07 H	10,34 C
USP-CB10	11,08 A	3,01 D	30,99 A
USP-CC11	6,49 D	3,21 B	12,61 B
USP-CC12	3,33 L	3,78 A	9,44 C
USP-CC13	8,92 B	2,20 G	11,70 B
USP-CC14	4,81 H	1,02 O	1,92 N
USP-CC15	8,35 C	1,99 I	7,76 E
USP-CC16	5,55 F	2,59 E	6,28 F
USP-CC17	5,74 F	1,00 O	2,17 M
USP-CC18	5,39 G	3,10 C	7,74 E
USP-CC19	6,63 D	2,62 E	6,54 F
USP-CC20	3,07 M	0,83 P	0,90 R
USP-CC21	6,07 E	3,06 C	7,82 E
USP-CC22	6,03 E	0,77 Q	1,41 P
USP-CC23	3,80 J	3,28 B	8,54 D
USP-CC24	4,39 I	2,89 D	9,70 C
USP-CC25	1,65 R	0,68 R	0,33 S
USP-CC27	4,81 H	1,66 K	2,96 J
USP-CC28	3,98 J	3,10 C	8,96 D
USP-CB34	3,51 K	2,94 D	8,66 D
USP-CC35	2,76 N	1,82 J	2,34 L
USP-CC36	1,95 P	1,52 L	1,65 O
USP-CC37	2,48 O	1,67 K	1,94 N
USP-CC38	1,92 P	1,42 M	1,46 P
USP-CC39	1,43 S	1,92 I	2,64 K
USP-CC40	4,75 H	2,94 D	7,27 E
USP-CC41	5,83 F	2,94 D	10,25 C
USP-CC42	1,78 Q	1,28 N	1,05 Q
USP-CC43	6,10 E	2,03 H	5,29 G
USP-CC44	3,05 M	2,39 F	3,65 H
USP-CC46	4,28 I	3,68 A	10,30 C
USP-CC47	4,16 I	2,84 D	7,75 E
Média	4,74	2,24	6,47
CV (%)	14,0	10,13	24,58

¹Dados originais, sendo que para a análise estatística os dados foram transformados utilizando a metodologia Box-Cox. ²Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem à mesma classe de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

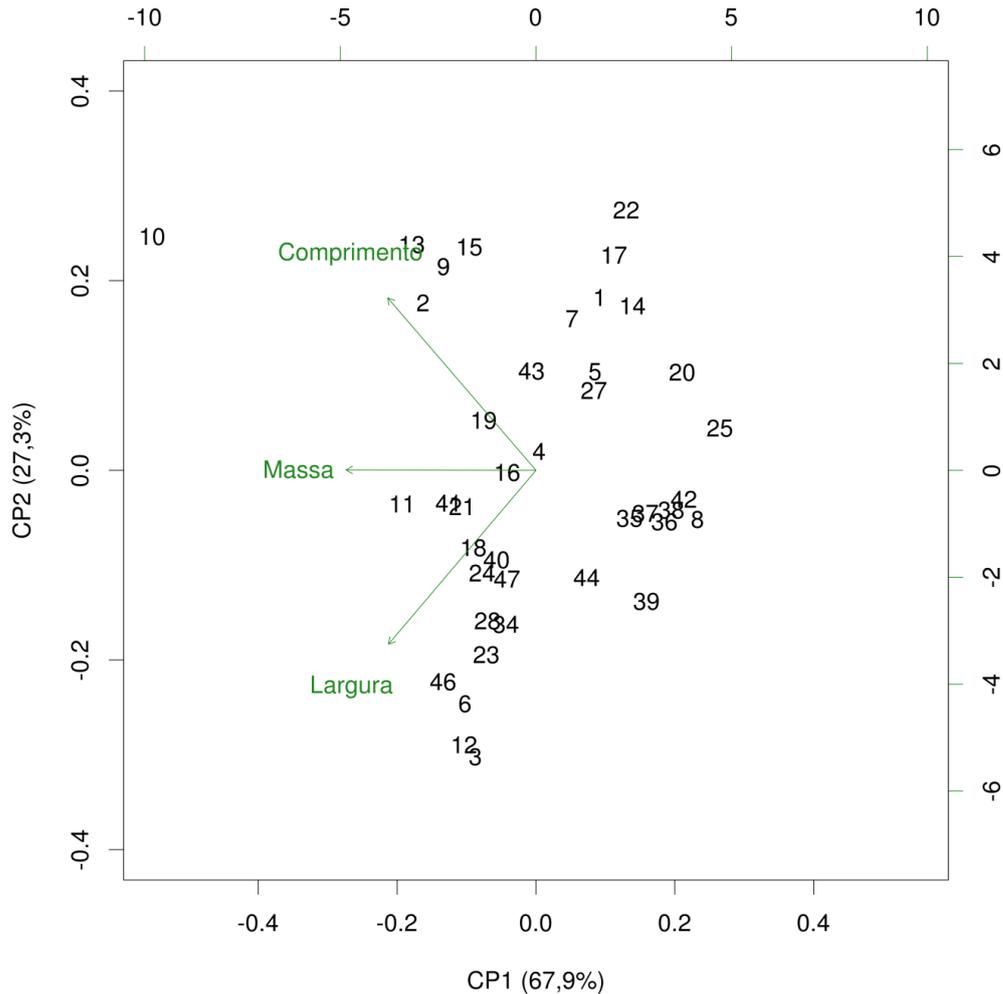


Figura 4. Biplot da análise de componentes principais para as três variáveis quantitativas comprimento, largura e massa fresca de fruto de *Capsicum* spp.

2.3.2. Análise de agrupamentos

A dissimilaridade entre os 40 acessos foi estimada utilizando o Algoritmo de Gower, sendo os pares mais divergentes USP-CB10 e USP-CC36 com uma distância de 0,818, enquanto que os acessos USP-CC09 e USP-CC13 foram considerados como os mais similares com a distância de 0,015. Considerando apenas acessos da espécie *C. chinense*, o maior coeficiente de dissimilaridade (0,708) foi observado entre os acessos USP-CC12 e USP-CC37. A matriz de distâncias entre os acessos permitiu a geração do dendrograma pelo método aglomerativo hierárquico UPGMA (Figura 5) e a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Figura 6). Cinco grupos foram formados a partir da análise gráfica do dendrograma obtido, com uma correlação cofenética de 0,77 entre o agrupamento obtido pelo dendrograma e a matriz de distância a 1% de significância.

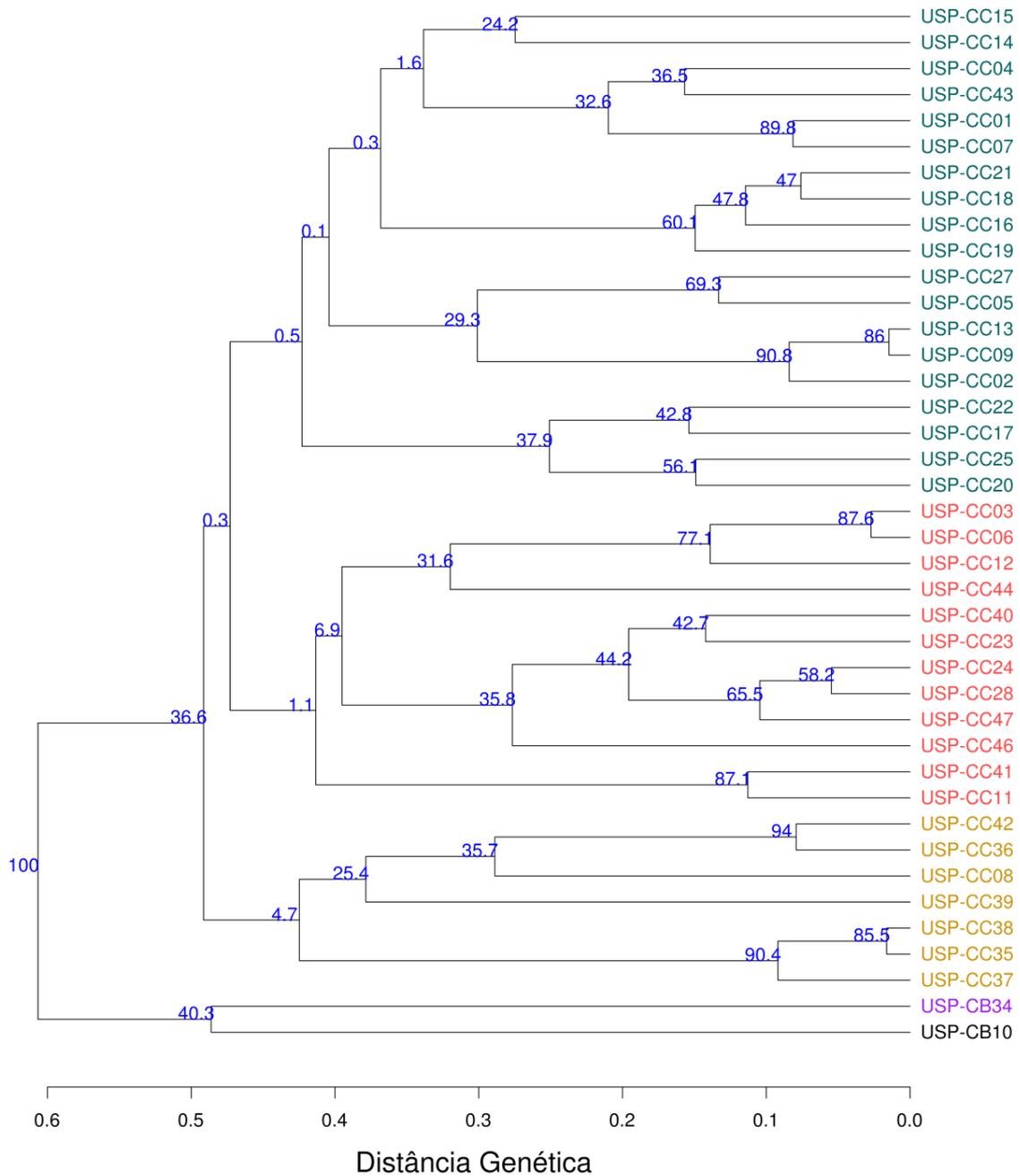


Figura 5. Dendrograma obtido pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade de Gower e índice de confiança obtido por reamostragem do tipo bootstrap com 10.000 repetições (em azul) para 40 acessos de pimenta *Capsicum* spp. Cores diferentes representam agrupamentos distintos.

O Grupo 1 corresponde ao maior grupo com 19 acessos (USP-CC01, USP-CC02, USP-CC04, USP-CC05, USP-CC07, USP-CC09, USP-CC13, USP-CC14, USP-CC15, USP-CC16, USP-CC17, USP-CC18, USP-CC19, USP-CC20, USP-CC21, USP-CC22, USP-CC25, USP-CC27, USP-CC43), em que houve a predominância de acessos com frutos alongados sendo apenas três acessos com formato triangular. A forma do ápice do fruto para todos os acessos foi pontiaguda, houve grande variação na

massa fresca que variou de 0,33 g e 11,70 g. Dentro deste grupo houve a formação de um subgrupo composto por USP-CC17, USP-CC22, USP-CC20 e USP-CC25, também com frutos de forma alongada, que se divergiu do grupo anterior devido à ausência de constrição no cálice, além disso, o comprimento médio (4,12 cm), diâmetro médio (0,82 cm) e a massa fresca média (1,20 g) dos frutos foram menores em relação aos demais acessos (valores médios de comprimento, diâmetro e massa fresca de 6,29 cm, 2,08 cm e 6,32 g, respectivamente). Todos os quatro acessos deste subgrupo apresentaram frutos de coloração vermelha e superfície lisa. Estes quatro genótipos correspondem aos acessos que podem ser classificados tanto como *C. annuum* ou *C. frutescens*.

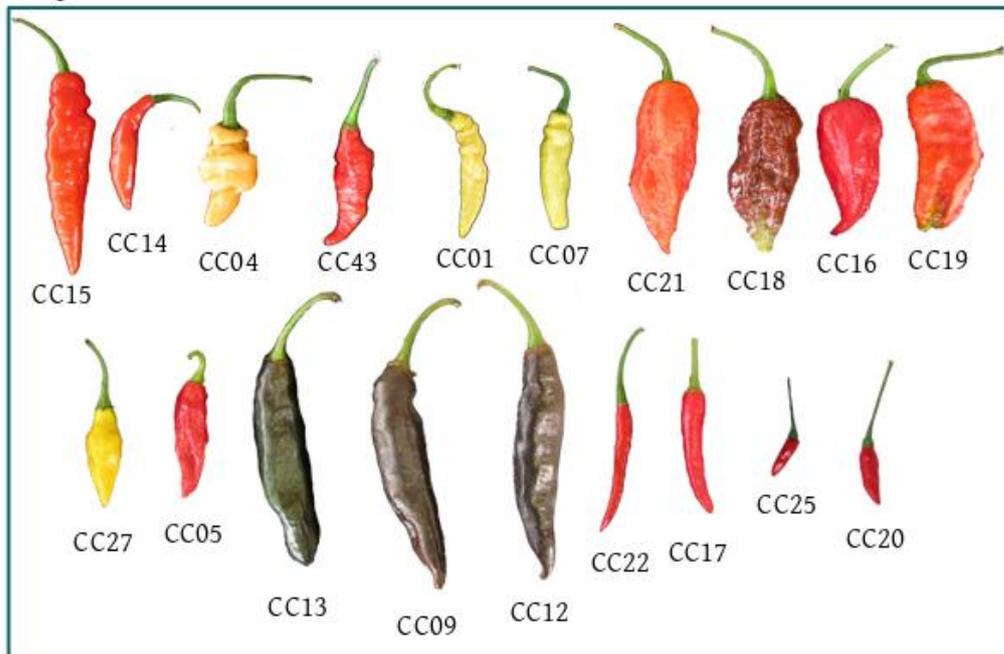
O Grupo 2 foi o segundo maior grupo formado, com 12 acessos (USP-CC03, USP-CC06, USP-CC11, USP-CC12, USP-CC23, USP-CC24, USP-CC28, USP-CC40, USP-CC41, USP-CC44, USP-CC46, USP-CC47) os quais apresentaram frutos com superfície predominantemente semienrugada e hábito de crescimento ereto ou intermediário. Os acessos com frutos de formato campanulado e retangular alocaram-se exclusivamente neste grupo, sendo o agrupamento com os frutos mais largos, com média de 3,20 cm. Apenas dois acessos apresentaram frutos de forma triangular (USP-CC11 e USP-CC41), os quais não foram pungentes e são popularmente denominados como pimenta de cheiro. Os acessos USP-CC23, USP-CC24, USP-CC28, USP-CC40, USP-CC46 e USP-CC47, que formam um subgrupo correspondente ao morfotipo ‘Habanero’, possuem frutos de formato retangular semienrugados, e foram os únicos que apresentaram estigma abaixo do nível das anteras.

O Grupo 3, composto por sete acessos (USP-CC08, USP-CC35, USP-CC36, USP-CC37, USP-CC38, USP-CC39, USP-CC42), apresentou exclusivamente frutos com superfície lisa e as menores médias quanto ao comprimento, largura e massa fresca de fruto (1,93 cm, 1,55 cm e 1,71 g, respectivamente). Quatro acessos apresentaram ápice arredondado e pungência, enquanto que os três acessos restantes desse grupo correspondem às pimentas do morfotipo ‘Biquinho’ (USP-CC35, USP-CC37, USP-CC38), os quais apresentaram frutos não pungentes, triangulares, pontiagudos, com superfície lisa, anteras roxas e estigmas acima do nível das anteras além de hábito de crescimento prostrado.

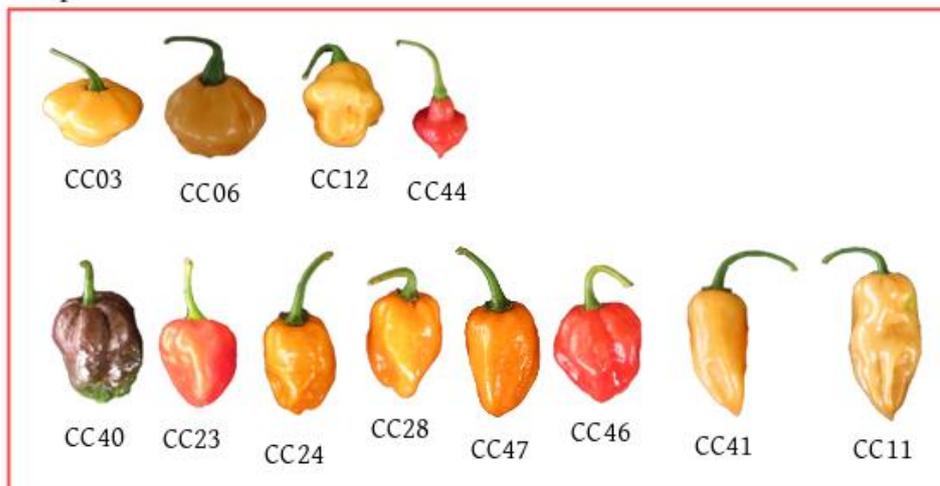
Os acessos de *C. baccatum* (USP-CB34 e USP-CB10) formaram dois grupos distintos (grupos 4 e 5, respectivamente), com um único acesso cada. Estes se diferenciaram dos demais devido à presença de manchas amarelas na corola e ausência de constrição no cálice, entretanto não se agruparam, devido à grande divergência morfológica existente entre ambos. O acesso USP-CB10 foi o que apresentou maiores dimensões de fruto em relação aos demais acessos estudados, sendo o mais divergente considerando o comprimento médio e massa fresca média de frutos (Tabela 3).

Pela análise de dispersão gráfica das Coordenadas Principais (Figura 7) é possível observar a proximidade entre os acessos e certa concordância com o agrupamento obtido pelo método hierárquico UPGMA. Entretanto, graficamente houve uma leve sobreposição entre os grupos 1 e 2, devido a existência de características semelhantes entre os acessos de ambos os grupos, além do fato de que são os grupos com os maiores números de acessos. A análise de agrupamentos por métodos hierárquicos e a Análise de Coordenadas Principais foram complementares para visualizar e verificar a similaridade e diversidade entre acessos de pimenta do banco de germoplasma.

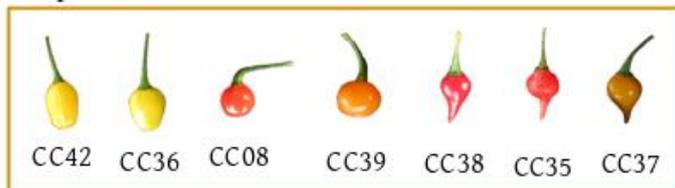
Grupo 01



Grupo 02



Grupo 03



Grupo 04



Grupo 05

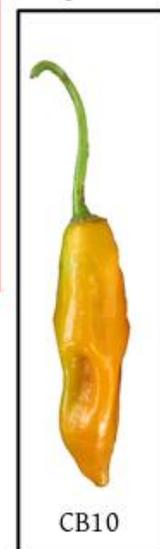


Figura 6. Frutos dos 40 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) caracterizados conforme o agrupamento da Figura 5.

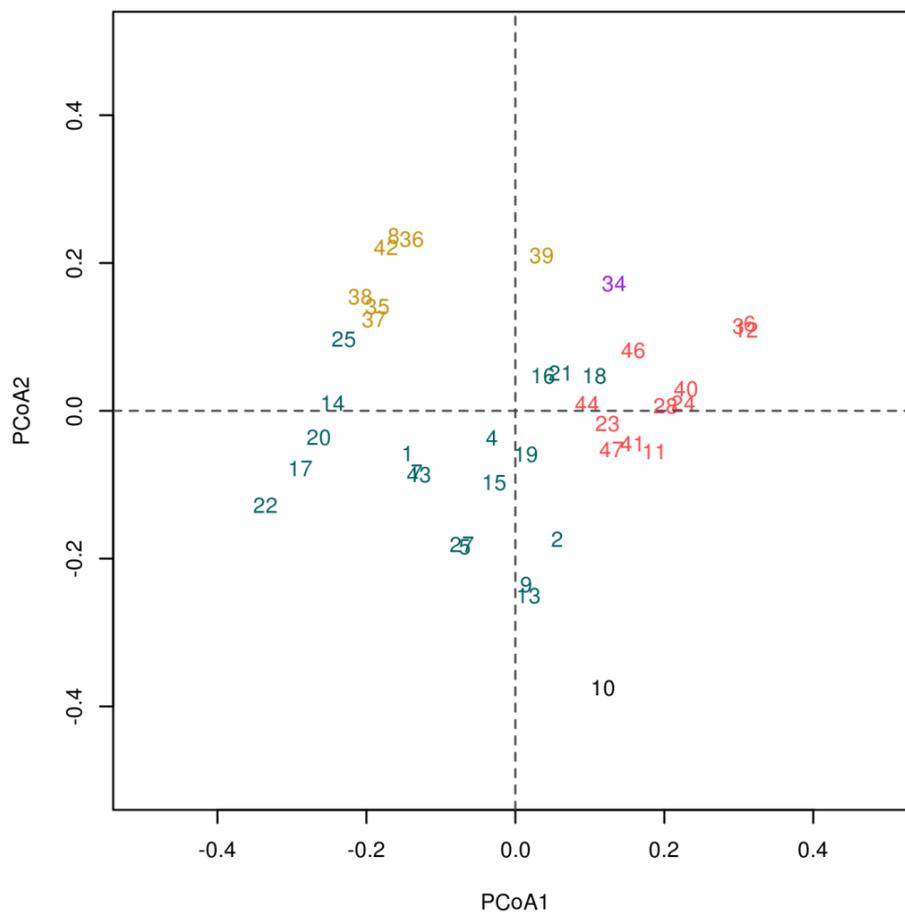


Figura 7. Gráfico de dispersão das duas primeiras coordenadas principais para os 40 acessos de *Capsicum* spp., mostrando o agrupamento em cinco classes.

REFERÊNCIAS

- Alves SRM (2009) Caracterização de genótipos de pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.). Universidade Federal do Amazonas, 74p.
- Araújo CMM, Silva Filho DF, Ticona-Benavente CA e Batista MRA (2018) Morphoagronomic characteristics display high genetic diversity in Murupi chili pepper landraces. **Horticultura Brasileira** 36: 83–87.
- Baba VY, Rocha KR, Gomes GP, de Fátima Ruas C, Ruas PM, Rodrigues R e Gonçalves LSA (2015) Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution** 63: 1371–1381.
- Baral JB e Bosland PW (2004) Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 129: 826–832.
- Barbieri RL e Neitzke RS (2008) Pimentas do gênero *Capsicum*. EMBRAPA, Brasília, DF, p. 729–745. In Barbieri RL e Stumpf ERT (orgs) **Origem e evolução de plantas cultivadas**.
- Bharath SM, Cilas C e Umaharan P (2013) Fruit trait variation in a caribbean germplasm collection of aromatic hot peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). **HortScience** 48: 531–538.

- Bianchi PA, Dutra IP, Moulin MM, Santos JO e Santos Júnior AC (2016) Morphological characterization and analysis of genetic variability among pepper accessions. **Ciência Rural** **46**: 1151–1157.
- Borovsky Y, Sharma VK, Verbakel H e Paran I (2015) CaAP2 transcription factor is a candidate gene for a flowering repressor and a candidate for controlling natural variation of flowering time in *Capsicum annuum*. **Theoretical and Applied Genetics** **128**: 1073–1082.
- Bosland PW e Baral JB (2007) “Bhut Jolokia” - The world’s hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. **HortScience** **42**: 222–224.
- Campodonico OP (1983) Estimates of natural cross-pollination in Serrano pepper (*Capsicum annuum* L.). Turin, Italy, p. 113–115. In **Capsicum Newsletter** **2**.
- Carrizo García C, Barfuss MHJ, Sehr EM, Barboza GE, Samuel R, Moscone EA e Ehrendorfer F (2016) Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). **Annals of Botany** **118**: 35–51.
- Carvalho SIC de, Bianchetti L de B, Ribeiro CS da C e Lopes CA (2006) **Pimentas do Gênero *Capsicum* no Brasil**. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 27p.
- Carvalho SIC, Ragassi CF, Bianchetti LB, Reifschneider FJB, Buso GSC e Faleiro FG (2014) Morphological and genetic relationships between wild and domesticated forms of peppers (*Capsicum frutescens* L. and *C. chinense* Jacquin). **Genetics and molecular research** **13**: 7447–7464.
- Domenico CI, Coutinho JP, Godoy HT e Melo AM (2012) Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. **Horticultura Brasileira** **30**: 466–472.
- Fonseca RM, Lopes R, Barros WS, Lopes MTG e Ferreira FM (2008) Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accessions along the upper Rio Negro - Amazonas. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **8**: 187–194.
- Hayano-Kanashiro C, Gámez-Meza N e Medina-Juárez LÁ (2016) Wild pepper *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*: taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. **Crop Science** **56**: 1–11.
- IPGRI (1995) Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.). p. 114.
- Jarret RL e Berke T (2008) Variation for fruit morphological characteristics in a *Capsicum chinense* Jacq. germplasm collection. **HortScience** **43**: 1694–1697.
- Justino E, Fonseca M, Ferreira M, Boiteux L, Silva P e Nascimento W (2018) Estimate of natural cross-pollination rate of *Capsicum annuum* using a codominant molecular marker associated with fruit pungency. **Genetics & Molecular Research** **17**: 1–9.
- Martins KC, Souza SAM, Pereira TNS, Rodrigues R, Pereira MG e Cunha M da (2018) Caracterização palinológica e divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. **Horticultura Brasileira** **31**.
- Moreira AFP, Ruas PM, Ruas C de F, Baba VY, Giordani W, Arruda IM, Rodrigues R e Gonçalves LSA (2018) Genetic diversity, population structure and genetic parameters of fruit traits in *Capsicum chinense*. **Scientia Horticulturae** **236**: 1–9.
- Moscone EA, Scaldaferrero MA, Grabiele M, Cecchini NM, Sánchez García Y, Jarret R, Daviña JR, Ducasse DA, Barboza GE e Ehrendorfer F (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* - solanaceae): a cytogenetic perspective. **Acta Horticulturae** **745**: 137–170.

- Neitzke RS, Fischer SZ, Vasconcelos CS, Barbieri RL, Treptow RO, Neitzke RS, Fischer SZ, Vasconcelos CS, Barbieri RL e Treptow RO (2016) Pimentas ornamentais: aceitação e preferências do público consumidor. **Horticultura Brasileira** **34**: 102–109.
- Nuez Viñals F, Gil Ortega R e Costa García J (1996) **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Mundi-Prensa, Madrid, 607p.
- Odland ML e Porter AM (1941) A study of natural crossing in peppers (*Capsicum frutescens*). **American Society for Horticultural Science** 585–588.
- Padilha HKM e Barbieri RL (2016) Plant breeding of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae) – A review. **Sciences, Australian Journal of Basic and Applied** **10**: 148–154.
- Padilha HKM, Sosinski ÊE e Barbieri RL (2016) Morphological diversity and entropy of peppers (*Capsicum baccatum* and *Capsicum chinense*, solanaceae). **International Journal of Current Research** **8**: 42758–42766.
- Pickersgill B (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. Elsevier, Amsterdam, p. 139–160. In Tsuchiya T e Gupta P (orgs) **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution**.
- Pickersgill B (2007) Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany** **100**: 925–940.
- Pickersgill B (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica** **96**: 129–133.
- Pickersgill B (1977) Taxonomy and the origin and evolution of cultivated plants in the New World. **Nature** **268**: 591–595.
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rêgo ER, Finger FL, Bolsista NFN, Araújo ER e Sapucay MJLC (2011) Genética e melhoramento de pimenteiras *Capsicum* spp. Imprima, Recife, p. 117–135. In Rêgo ER, Finger FL, e Rêgo MM (orgs) **Produção, genética e melhoramento de pimentas (Capsicum spp.)**.
- Ribeiro CSC, Carvalho SIC., Lopes CA. e Reifschneider FJB (2008) **Pimentas Capsicum**, 1º ed. EMBRAPA, Brasília, DF, 200p.
- Smith PG e Heiser CB (1957) Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club** **84**: 413–420.
- Srikanth A e Schmid M (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. **Cellular and Molecular Life Sciences** **68**: 2013–2037.
- Sudré CP, Gonçalves LSA, Rodrigues R, do Amaral Junior AT, Riva-Souza EM e dos S. Bento C (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research** **9**: 283–294.
- Tanksley SD (1984) High rates of cross-pollination in chile pepper. **HortScience (USA)** **19**: 580–582.
- Valls JFM (2007) Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. EMBRAPA, Brasília, DF, p. 281–305. In Nass LL (org) **Recursos Genéticos Vegetais**.
- Vasconcelos CS De, Barbieri RL, Neitzke RS, Fischer SZ e Mistura CC (2014) Distância genética entre variedades crioulas de *Capsicum chinense*. **Magistra** **26**: 178–185.
- Vasconcelos CS de, Barbieri RL, Neitzke RS, Priori D, Fischer SZ e Mistura CC (2012) Determinação da dissimilaridade genética entre acessos de *Capsicum chinense* com base em características de flores. **Revista Ceres** **59**: 493–498.

- Villela JCB, Barbieri RL, Padilha HKM, Neitzke RS e Gomes GC (2018) Os recursos genéticos de pimentas e o empoderamento dos agricultores de Turuçú. **Revista RG News 4**: 7–13.
- Yamamoto S, Misumi M e Nawata E (2007) Effects of various photoperiods on flowering in *Capsicum frutescens* and *C. annuum*. **Environment Control in Biology 45**: 133–142.

3. TAXA DE CRUZAMENTO EM *Capsicum chinense*

RESUMO

As pimentas do gênero *Capsicum* são capazes de realizar tanto autofecundação como fecundação cruzada, porém estudos referentes à taxa de cruzamento natural ainda são escassos, apesar da importância desta informação para o melhoramento de plantas e conservação de recursos genéticos. Neste trabalho estimou-se a taxa de cruzamento natural para acessos da espécie *C. chinense*, a partir da observação de um conjunto de marcadores morfológicos. A taxa de cruzamento foi estimada para três acessos que foram selecionados como genitores (USP-CC15, USP-CC28 e USP-CC35), com características contrastantes e tempo de florescimento semelhante. O delineamento foi composto de três repetições que consistiam em módulos de três plantas contendo uma planta de cada genótipo. Híbridagens artificiais para todas as combinações foram realizadas a fim de se verificar a expressão dos marcadores morfológicos na progênie. A fecundação cruzada entre os genitores resultou em plantas híbridas morfológicamente distintas de fácil identificação visual em campo. A metodologia utilizada permitiu determinar a direção da ocorrência do cruzamento e comparar o potencial de cada acesso como doador e receptor de pólen. A taxa de cruzamento foi estimada calculando-se a frequência de indivíduos diferentes da planta genitora. A espécie *C. chinense* demonstrou possuir sistema reprodutivo misto com taxa de cruzamento médio de 13,1%, que variou principalmente conforme o genótipo. A maior taxa média de autofecundação foi do acesso USP-CC28, cujo estigma encontrava-se abaixo do nível das anteras. O acesso USP-CC15 apresentou a maior taxa de fecundação cruzada variando de 11,1% a 40,6% para plantas individuais, porém como genitor masculino foi o que gerou menos descendentes.

Palavras-chave: Pimentas; Sistema reprodutivo misto; Marcadores morfológicos; Híbridagens

ABSTRACT

Capsicum peppers are capable of both self-fertilization and cross-fertilization, but studies of the natural outcrossing rate are still scarce despite the importance of this information for plant breeding and conservation of genetic resources. In this work the natural outcrossing rate for *C. chinense* species was estimated from a set of morphological markers. The outcrossing rate was calculated for three accessions selected as parents (USP-CC15, USP-CC28 and USP-CC35), with distinct characteristics and similar flowering time. The experimental design was composed of three replicates that consisted of modules of three plants containing one plant of each genotype. Artificial hybridizations for all combinations were performed in order to verify the expression of the morphological markers in the progeny. Cross-fertilization between the parents resulted in morphologically distinct hybrid plants easily identified in the field by observation. This methodology allowed to determine the direction of occurrence of the crossing and to compare the potential of each accession as recipient and donor of pollen. The outcrossing rate was estimated by calculating the frequency of individuals different from the parent plant. The species *C. chinense* exhibited a mixed reproductive system with an average of 13.1% outcrossing rate, which varied mainly according to the genotype. The highest mean self-fertilization rate was obtained by accession USP-CC28, whose stigma was below the anther level. USP-CC15 showed the highest outcrossing rate, ranging from 11.1% to 40.6%, although as the male parent, it generated the lowest number of offspring.

Keywords: Peppers; Mixed reproductive system; Morphological markers; Hybridization

3.1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do sistema reprodutivo de uma espécie cultivada é de fundamental importância quando se deseja o desenvolvimento de novas cultivares por meio de programas de melhoramento genético, dado que o tipo de reprodução influencia diretamente na estrutura genética das populações e dos indivíduos e, conseqüentemente, na escolha do método de melhoramento a ser utilizado. Além disso, informações sobre o modo de reprodução predominante permitem o direcionamento adequado dos trabalhos de multiplicação em bancos de germoplasmas e também pode ser útil na definição de estratégias adequadas para a coleta de acessos adicionais da espécie analisada (Valls 2007), bem como para a conservação e preservação de recursos genéticos.

As espécies domesticadas do gênero *Capsicum* possuem flores hermafroditas, são autocompatíveis, tolerantes à endogamia e convencionalmente conduzidas como linhas puras no melhoramento (Heiser Jr. 1976, Rêgo *et al.* 2011). De forma geral, as pimentas são classificadas como plantas autógamas (Allard 1971), com fecundação cruzada facultativa. As pimentas apresentam certas características que tendem a favorecer a alogamia, como a protoginia, detectada em *C. annuum* e *C. frutescens* (Campodonico 1983, Aleemullah *et al.* 2000, Cruz e Campos 2008); macho-esterilidade (Shifriss 1997), e estigma posicionado acima das anteras (Pickersgill 1997). Em *C. chinense*, o estigma pode se localizar acima, no mesmo nível ou abaixo das anteras (Luz 2007, Vasconcelos *et al.* 2012). Nas pimentas, a fecundação cruzada ocorre principalmente por polinização natural de insetos. Apesar de não ser totalmente dependente da ação destes agentes polinizadores para a fecundação (Costa *et al.* 2008), um maior pegamento, produção e qualidade de frutos, além de maior quantidade de sementes são observados quando a visitação de insetos é permitida (Cauch *et al.* 2006, Djian-Caporalino *et al.* 2006, Serrano e Guerra-Sanz 2006).

Cruzamentos espontâneos tem como consequência a geração de novas recombinações genéticas, causando variabilidade e desuniformidade entre plantas (Pereira *et al.* 2014). O aparecimento de plantas atípicas e a ocorrência de segregação conseqüente da fecundação não controlada são fenômenos frequentemente relatados por produtores e por alguns estudos com *Capsicum* (Raw 2000, Jarret e Berke 2008, Rêgo *et al.* 2011, Pereira *et al.* 2014). Em espécies que apresentam taxas de cruzamento elevadas são necessários alguns cuidados quando se objetiva a manutenção da pureza genética, seja na produção de sementes e no planejamento e execução de programas de melhoramento, bem como na multiplicação e regeneração de germoplasma (Tanksley 1984, Bosland 1993). Mais recentemente estudos referentes ao fluxo gênico têm sido realizados a fim de se acessar o risco de escape de genes. Apesar de não existirem cultivares geneticamente modificados do gênero *Capsicum* no Brasil, tal tecnologia tem sido desenvolvida em outros países visando à incorporação de resistência em cultivares (Kim *et al.* 2009a, 2009b).

Nas estimativas referentes ao cruzamento natural em pimentas (*Capsicum* spp.), grande variação tem sido encontrada na taxa de fecundação cruzada. Taxas de 7% a 37% foram estimadas em *C. frutescens* (Odland e Porter 1941), enquanto que em *C. annuum* taxas entre 2% a 91% foram identificadas (Tanksley 1984). Por outro lado, Justino *et al.* (2018), em um trabalho pioneiro no Brasil sobre a taxa de cruzamento

entre duas cultivares comerciais *C. annuum*, encontraram taxas de cruzamentos relativamente baixas (média de 1,2%). Diversos são os fatores bióticos e abióticos que influenciam na taxa de cruzamento entre plantas, tais como genótipo, morfologia floral, população e comportamento de agentes polinizadores, diversidade e distribuição espacial de plantas, condições climáticas, época de cultivo, entre outros.

Apesar das evidências de que a fecundação cruzada ocorre em pimentas, poucas são as informações para a espécie *C. chinense*, em que se verifica a inexistência de estudos sobre a taxa de cruzamento. *C. chinense* é altamente importante para o Brasil, pois além de seu centro de domesticação se localizar na Bacia Amazônica (Pickersgill 1971), esta espécie possui ampla adaptação às condições de clima quente e úmido, apresentando melhores níveis de resistência às principais doenças tropicais do que os verificados com outras espécies (Carvalho *et al.* 2006), atributo visado no melhoramento de plantas.

No presente trabalho objetivou-se a determinação da taxa de cruzamento entre acessos de *C. chinense*, utilizando marcadores morfológicos por meio de uma metodologia simples e de baixo custo.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Três acessos de pimenta da espécie *C. chinense*, identificadas como 'Ituiutaba' (USP-CC15), 'Habanero Laranja' (USP-CC28) e 'Biquinho' (USP-CC35), provenientes do banco de germoplasma da ESALQ/USP foram selecionados para a realização da estimativa da taxa de cruzamento. A escolha dos genótipos teve como base a caracterização morfoagronômica previamente realizada e descrita no Capítulo 2, cujos critérios de seleção priorizaram acessos da espécie *C. chinense* com período de florescimento semelhante e características morfológicas contrastantes, sendo essencial que os acessos pertencessem a agrupamentos distintos e, portanto, distantes geneticamente (Tabela 4).

As sementes dos acessos selecionados foram obtidas pela autofecundação de plantas típicas de cada acesso, por meio da proteção dos botões florais antes da antese. Tal procedimento visou evitar a possível ocorrência de fecundação cruzada, aumentando assim o nível de endogamia e homoziguidade. Estes acessos foram semeados em tubetes de 175 cm³ e transplantados após 70 dias em campo para a ocorrência de cruzamentos naturais. Esperou-se que as mudas estivessem em estágio mais avançado de desenvolvimento, pois o período de plantio não era recomendado para a espécie *C. chinense*, uma vez que esta é mais adaptada ao clima quente e úmido. Simultaneamente, foram conduzidos em estufa cruzamentos artificiais considerando todas as combinações possíveis entre os três acessos selecionados, antes da antese, sendo que as flores foram emasculadas e polinizadas manualmente no mesmo dia. Os híbridos obtidos foram utilizados como testemunhas para a avaliação das progênes de polinização natural.

Tabela 4. Agrupamento, tempo para florescimento, e características morfológicas divergentes dos acessos de *Capsicum chinense* escolhidos para a estimativa da taxa de cruzamento.

	Acesso (Nome Popular)		
	USP-CC15 (Ituiutaba)	USP-CC28 (Habanero Laranja)	USP-CC35 (Biquinho)
Grupo¹	1	2	3
Dias para floração (após semeadura)	95	88	88
Hábito de crescimento	Intermediário	Intermediário	Prostrado
Formato da folha	Ovalada	Ovalada	Deltóide
Cor do caule	Verde com estrias roxas	Verde	Verde
Posição do estigma	Levemente acima	Inserido	Acima
Forma do fruto	Alongado	Retangular	Triangular
Cor do fruto imaturo	Verde claro	Verde escuro	Verde claro
Cor do fruto maduro	Vermelho	Laranja	Vermelho
Superfície do fruto	Enrugada	Semienrugada	Lisa
Pungência	Sem pungência	Sim (forte)	Sim (muito fraca)

¹ Classificação proveniente da análise de agrupamento (Capítulo 2, Figuras 5 e 6).

O experimento foi instalado no campus da ESALQ, em área experimental do Departamento de Genética, e conduzido no período de maio a dezembro/2017 (Tabela 5). As plantas foram irrigadas manualmente, com adubações e controle de plantas daninhas realizados conforme as necessidades da cultura, sendo que não foram feitas aplicações de inseticidas a fim de não interferir na ocorrência de polinização entomófila. Para garantir o florescimento no mesmo período, foi feito o desbaste de flores abertas das plantas mais precoces, até que todas as plantas tivessem pelo menos uma flor aberta. Os acessos foram dispostos em módulos de três plantas, uma de cada genótipo, com espaçamento de 70 cm entre plantas e distância mínima de 20 m entre cada módulo, tendo sido utilizadas três repetições (Figura 8). Foram realizadas colheitas durante quatro semanas, em que todos os frutos maduros foram colhidos e tiveram suas sementes retiradas. Uma amostra de 128 sementes de cada planta mãe foi semeada em bandejas de poliestireno de 128 células e acondicionada em casa de vegetação para a formação das mudas. Quarenta e cinco dias após a semeadura as progênes foram transplantadas em campo, para a observação dos marcadores morfológicos e consequente determinação da taxa de cruzamento por meio da observação visual da frequência de indivíduos da progênie diferentes da planta mãe.

Tabela 5. Médias mensais de temperatura, umidade relativa e vento, e total de chuva nos meses de maio a dezembro de 2017 em Piracicaba - SP.

Mês	Temperatura Média (°C)	Precipitação (mm)	Umidade Relativa (%)	Vento Médio (Km/h)
Maio	20,5	161,6	81	6,4
Junho	18,4	17,8	78	6,2
Julho	17,4	0,0	68	7,1
Agosto	19,3	50,6	70	8,1
Setembro	23,0	46,7	55	8,0
Outubro	23,8	80,5	71	8,0
Novembro	23,3	235,7	73	8,7
Dezembro	25,2	148,6	76	7,7

Fonte: Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP. Departamento de Engenharia de Biossistemas. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. LEB-ESALQ-USP.

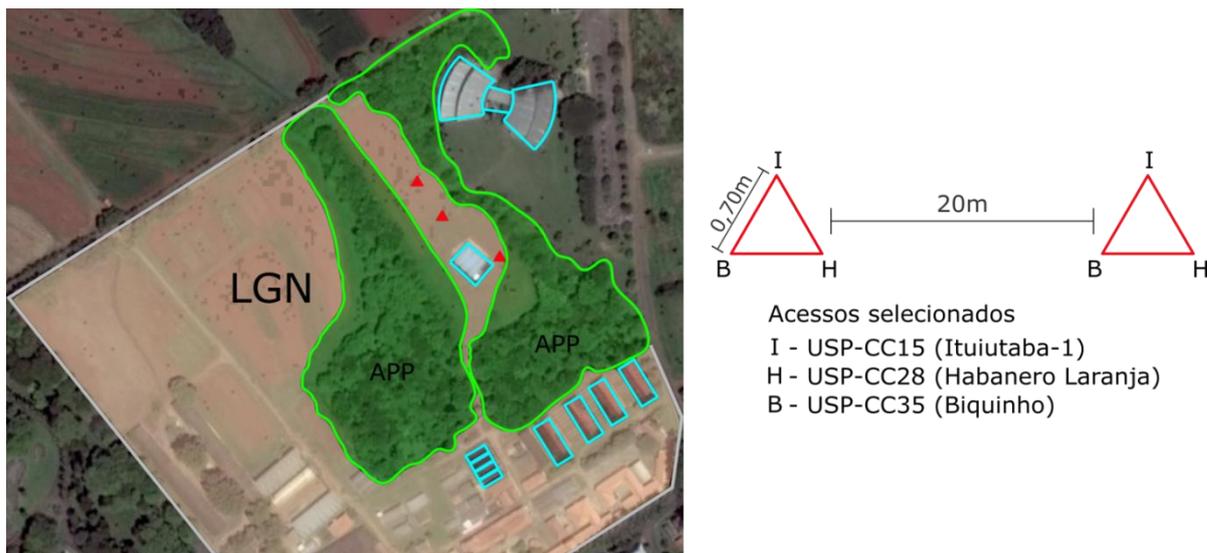


Figura 8. Localização no Departamento de Genética (LGN) da ESALQ/USP e representação esquemática da disposição dos módulos contendo três genótipos utilizados no estudo.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Considerações sobre a metodologia da estimativa da taxa de cruzamento

De modo geral, os modelos para estudos sobre taxa de cruzamento em condições de campo de cultivo utilizam um doador o qual possui um marcador genético, e um ou mais genótipos receptores em que tal característica encontra-se ausente. As taxas de cruzamento são então determinadas considerando apenas uma direção e limita-se a presença do marcador nas progênies dos genitores femininos. A ocorrência de cruzamentos com outras plantas que não possuem o marcador, bem como a taxa de cruzamento da fonte doadora muitas vezes não é acessada, podendo levar a subestimativas da taxa de cruzamento. Neste estudo, a metodologia proposta para o cálculo da taxa de cruzamento utilizou três genótipos, os quais foram ao mesmo tempo a fonte doadora e receptora, em que cada planta poderia realizar fecundação cruzada somente com outras duas.

A identificação da ocorrência de cruzamentos foi realizada por meio da observação visual, de modo que foi necessário que os acessos selecionados como genitores possuíssem elevada endogamia e fossem distantes geneticamente para as características morfológicas. Caso o genitor possua muitos locos em heterozigose, as próximas gerações poderiam apresentar alta segregação dificultando a identificação morfológica dos indivíduos oriundos de autofecundação ou fecundação cruzada. Tal condição foi garantida e verificada quando sementes obtidas por autofecundação artificial durante a fase de multiplicação de germoplasma produziram plantas uniformes, não sendo observada a ocorrência de segregação para os caracteres utilizados como marcadores morfológicos, viabilizando assim o uso dos acessos USP-CC15, USP-CC28 e USP-CC35 como genitores.

A fase inicial de caracterização do germoplasma foi essencial para a escolha dos genótipos contrastantes e com período de início de florescimento similar. O início do florescimento em *C. chinense* pode variar de 70 e 110 dias após a sementeira (Capítulo 2). O florescimento sincronizado dos acessos escolhidos procurou evitar que os mais precoces pudessem apresentar uma taxa de autofecundação maior devido a não disponibilidade de pólen de outros genótipos, e que os acessos mais tardios tivessem maior possibilidade de fecundação cruzada devido a uma maior abundância de pólen dos genótipos mais precoces. Quando se deseja combinar genótipos com florescimento muito distintos, uma prática comum é o escalonamento do plantio para que o florescimento ocorra no mesmo período. Por outro lado, essa separação temporal do florescimento entre genótipos também pode ser explorada como uma forma a evitar cruzamentos indesejados.

A expressão dos marcadores morfológicos foi verificada a posteriori por meio da realização de cruzamentos artificiais para todas as combinações possíveis de cruzamento entre os genótipos selecionados, resultando em três híbridos (USP-CC15xUSP-CC28, USP-CC15xUSP-CC35, USP-CC28xUSP-CC35), os quais foram morfológicamente distintos entre si e em relação aos pais, permitindo a identificação em campo das plantas oriundas da fecundação cruzada em cada progênie, bem como a direção do cruzamento (Figura 9, Tabela 6).

A presença de antocianina no caule foi uma característica apresentada unicamente pelo genótipo 'Ituiutaba' (USP-CC15) e cuja expressão demonstrou ter caráter dominante. Esta característica pôde ser utilizada como marcador morfológico para identificar USP-CC15 como o doador de pólen nas progênies de USP-CC28 e USP-CC35. Nas progênies cujo receptor era USP-CC15, as plantas híbridas foram identificadas pela presença de pungência, coloração e formato de frutos. As plantas que apresentaram frutos em estágio imaturo de coloração verde escura foram identificadas como híbridos cujo doador de pólen foi o USP-CC28; já as plantas com frutos imaturos verde claro e de formato campanulado eram oriundas do cruzamento natural com USP-CC35. A identificação de híbridos em progênies do receptor USP-CC28 pôde ser realizada a partir da presença de antocianina no caule, formato e coloração do fruto. O genótipo 'Habanero Laranja' (USP-CC28) caracteriza-se por frutos em estágio imaturo de coloração verde escura e formato retangular tornando-se laranja na maturação. Plantas que apresentavam frutos alongados e coloração vermelha com pigmentação no caule tiveram como genitor masculino o acesso USP-CC15. Quando o doador de pólen era o acesso USP-CC35, as plantas híbridas apresentavam frutos campanulados, verde claro quando imaturos e coloração vermelha quando maduros. Para a diferenciação entre plantas oriundas de cruzamento e autofecundação nas progênies de 'Biquinho' (USP-CC35), foram utilizados como marcadores a presença de antocianina no caule, formato de fruto e superfície do fruto. Plantas que apresentavam frutos pungentes de formato campanulado ('pião') e superfície semienrugada eram oriundas do cruzamento com 'Habanero Laranja'; já as plantas com frutos campanulados alongados e superfície semienrugada eram oriundas do cruzamento com USP-CC15.

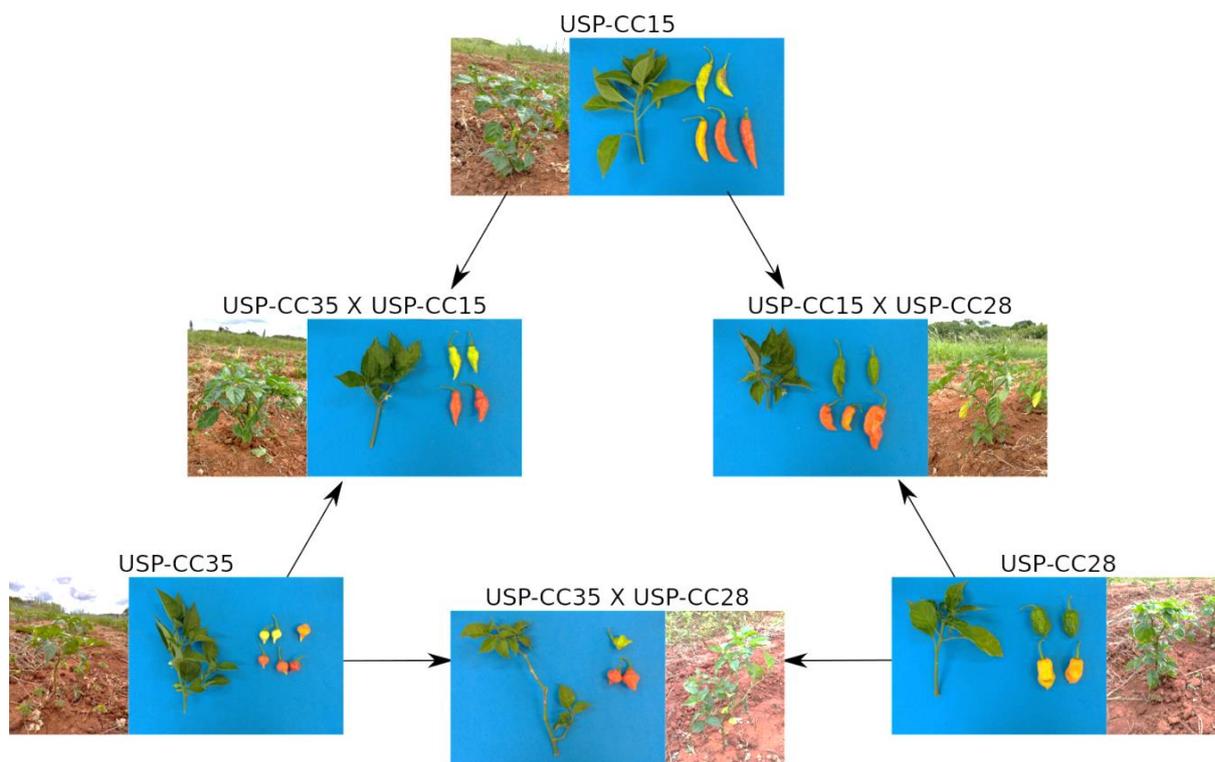


Figura 9. Fenótipo dos acessos de *Capsicum chinense* selecionados como genitores e de seus híbridos correspondentes.

Tabela 6. Conjunto de características utilizadas como marcadores morfológicos para identificação dos indivíduos da progênie de *Capsicum chinense* oriundos de fecundação cruzada e determinação da direção do cruzamento.

	Híbrido		
	USPCC35 X USP-CC28 (Biquinho x Habanero)	USP-CC35 X USP-CC15 (Biquinho x Ituiutaba)	USP-CC15 X USP-CC28 (Ituiutaba x Habanero)
Hábito de crescimento	Intermediário	Intermediário	Intermediário
Formato da folha	Deltoide	Ovalada	Ovalada
Cor do caule	Verde com estrias roxas	Verde	Verde com estrias roxas
Posição do estigma	Levemente acima	Levemente acima	Levemente acima
Forma do fruto	Campanulado	Campanulado ('pião')	Alongado
Cor do fruto imaturo	Verde claro	Verde claro	Verde escuro
Cor do fruto maduro	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Superfície do fruto	Enrugada	Semienrugada	Semienrugada
Pungência	Sim (fraca)	Sim	Sim

Em relação ao delineamento espacial, cada módulo ou parcela continha uma planta de cada genótipo e que se encontravam equidistantes. Esta condição garantiu que todas as plantas tivessem a mesma probabilidade de cruzamento. O desbalanceamento no número de indivíduos pode levar tanto a uma subestimativa para o genótipo que estiver em maior número devido à ocorrência de fecundação cruzada entre plantas diferentes pertencentes ao mesmo genótipo, cujos descendentes serão considerados como oriundos de autofecundação, ou a uma superestimativa para o genótipo em menor número, pois taxas mais elevadas de cruzamento pode ser consequência da maior densidade de pólen do outro genótipo. Kim *et al.* (2009a, 2009b) obtiveram estimativas menores de taxa de cruzamento em *C. annuum*

em relação aos estudos anteriores (Campodonico 1983, Tanksley 1984, Ahmed e Tanki 1994), ressaltando que a planta doadora encontrava-se em menor número.

O número total de plantas avaliadas de todas as progênes foi 732, obtidas a partir da amostragem de sementes retiradas de todos os frutos maduros. Este procedimento procurou evitar que poucos frutos fossem amostrados, dado que diferentes taxas podem ser encontradas em frutos diferentes de uma mesma planta, conforme observado em tomate (Horneburg e Becker 2018). Além disso, diferentes períodos de colheita podem resultar em taxas de cruzamento diferentes. Em pimentas, Justino *et al.* (2018) colheram os primeiros frutos maduros, amostraram 16 sementes de cada fruto e estimaram uma taxa de cruzamento de 1,2%. Na Coréia do Sul, (Kim *et al.* 2009a, 2009b) observaram um decréscimo na taxa de cruzamento nos frutos coletados em setembro quando comparados a agosto, o que foi associado a redução da atividade dos agentes polinizadores devido ao início do estação chuvosa durante o período de polinização em torno de dois meses antes da maturação dos frutos.

Diversos são os fatores que influenciam na taxa de cruzamento em plantas, havendo uma grande dificuldade em entender os mecanismos que causam a variação no sistema reprodutivo (Barrett e Harder 2017). A metodologia desenvolvida para a estimativa da taxa de cruzamento demonstrou ser simples e de baixo custo, cujo modelo básico pode ser adaptado para investigações mais detalhadas dos efeitos dos fatores nas taxas de cruzamento. A instalação dos módulos requer pouco espaço físico, de modo que diferentes condições ambientais (e. g. distância entre plantas, épocas e localização geográfica), períodos de colheita poderiam ser avaliados. O conhecimento do efeito do ambiente pode ser útil no estabelecimento de estratégias para os programas de melhoramento. Por exemplo, sabendo-se os períodos e locais com maior ou menor atividade de insetos o melhorista pode escolher a época de cultivo ou colheita quando se deseja o avanço de geração para endogamia. Na disponibilidade de informações quanto à diversidade molecular as taxas de cruzamento podem ser estimadas mais precisamente por meio de marcadores moleculares. A metodologia, no entanto, limita-se ao uso de três de genótipos por módulo uma vez que este é o único número em que a disposição espacial permite que todas as plantas estejam equidistantes entre si. Além disso, o aumento do número de genótipos dentro de um módulo poderia dificultar a seleção de genótipos altamente contrastantes, aumentando o número de combinações híbridas e, conseqüentemente, dificultando a avaliação visual, porém diferentes combinações de três genótipos podem ser utilizadas.

3.3.2. Taxa de cruzamento em *C. chinense*

As plantas podem ser classificadas quanto ao seu sistema reprodutivo como autógamias, alógamas ou mistas, a depender da taxa de cruzamento (t) ou autofecundação (S). A espécie *C. chinense* apresentou comportamento reprodutivo misto com taxas de cruzamento variáveis conforme o genótipo. A taxa de cruzamento calculada a partir de todas as progênes foi de 13,1% (SD=9,8) e variou de 0% a 40,6%. O genótipo 'Ituiutaba' (USP-CC15) apresentou a maior taxa média de cruzamento, de 30,4%

(SD=16,7), seguido de ‘Biquinho’ (USP-CC35), em que 7,2% (SD=2,6) dos indivíduos de sua progênie foram heterozigóticos. Já o genótipo ‘Habano Laranja’ (USP-CC28) apresentou maior número de indivíduos autofecundados, com uma menor taxa de cruzamento, de 1,6% (SD=1,7) (Tabela 7).

Todos os acessos foram capazes de autofecundar e cruzar naturalmente com os demais genótipos disponíveis, sendo observadas todas as combinações híbridas dentro de cada progênie materna. Dentro da família do genitor feminino USP-CC15, em média 19,8% foram resultantes do cruzamento natural com USP-CC35, e 10,6% foram híbridos do tipo USP-CC15xUSP-CC28. Na família USP-CC35, em média 3,8% foram descendentes do genitor masculino USP-CC28, e 3,4% de USP-CC15. Quanto à família USP-CC28, 1,1% foram híbridos do tipo USP-CC28xUSP-CC35, enquanto que apenas 0,5% foram híbridos do tipo USP-CC28xUSP-CC15 (Tabela 7, Figura 10). Em relação ao potencial dos genótipos como doadores de pólen, USP-CC35 foi o que deu origem a um maior número de indivíduos heterozigotos (20,9%). USP-CC28 apresentou-se intermediário, com 14,4%; já o genótipo USP-CC15 como genitor masculino, produziu menos descendentes, tanto por apresentar menor autopolinização como por estar associado às menores taxas de fecundação cruzada apresentadas por USP-CC28 e USP-CC35.

Tabela 7. Taxas de cruzamento e autofecundação (S) (em itálico) entre três acessos de *Capsicum chinense*. Valores em porcentagem (%).

Genitor feminino	Repetição (número de indivíduos)	Genitor Masculino			Taxa de cruzamento (%)
		UPS-CC15	USP-CC28	USP-CC35	
USP-CC15 (Ituiutaba)	1 (101)	<i>59,4</i>	19,8	20,8	40,6
	2 (90)	<i>88,9</i>	2,2	8,9	11,1
	3 (71)	<i>60,6</i>	9,9	29,6	39,4
	Média	S = <i>69,6</i>	10,6	19,8	T=30,4
	Desvio padrão (SD)	-	8,8	10,4	16,7
USP-CC28 (Habano Laranja)	1 (89)	0,00	<i>96,6</i>	3,4	3,4
	2 (69)	1,5	<i>98,6</i>	0,0	1,5
	3 (81)	0,00	<i>100,0</i>	0,0	0,0
	Média	0,5	S = <i>98,4</i>	1,1	T=1,6
	Desvio padrão (SD)	0,8	-	2,0	1,7
USP-CC35 (Biquinho)	1 (89)	4,4	5,6	<i>90,0</i>	10,1
	2 (62)	3,2	3,2	<i>93,6</i>	6,5
	3 (80)	2,5	2,5	<i>95,0</i>	5,0
	Média	3,4	3,8	S = <i>92,8</i>	T=7,2
	Desvio padrão (SD)	1,0	1,6	-	2,6
Média do doador (%)		3,9	14,4	20,9	13,1
Desvio padrão (SD)		2,1	4,8	13,2	9,8

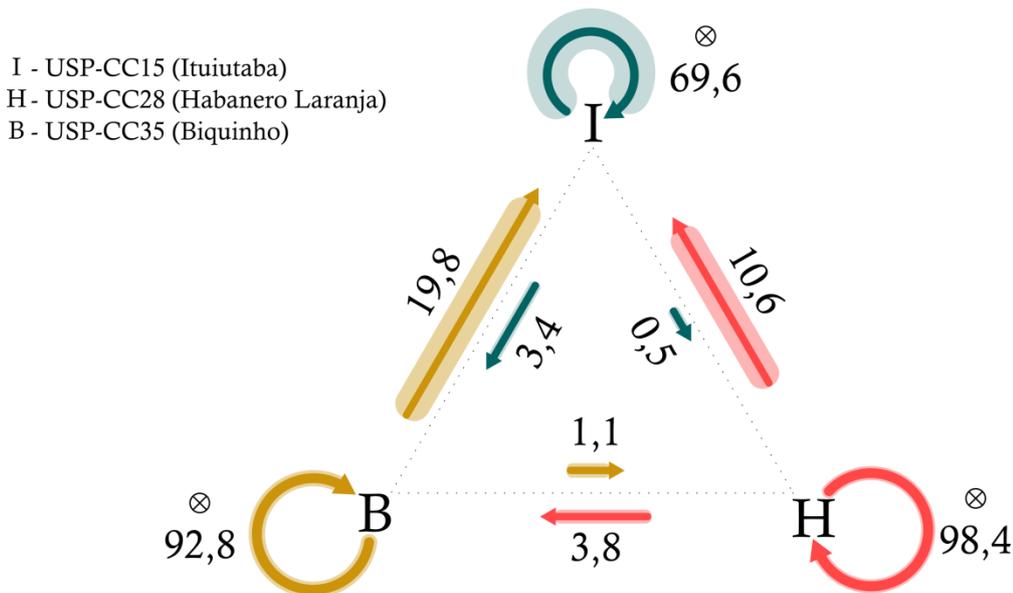


Figura 10. Direção do cruzamento e autofecundação entre três acessos de *Capsicum chinense*. Setas indicam a direção do fluxo de pólen (USP-CC15 – azul, USP-CC28 – vermelho, USP-CC35 – marrom), números acima das setas são os valores médios em porcentagem (%) da taxa de fecundação cruzada e autofecundação dos receptores, conforme o doador de pólen. Regiões sombreadas ao redor das setas representam a magnitude da variação da taxa de cruzamento ou autofecundação.

Os três genótipos utilizados apresentam características de pimentas domesticadas, tais como frutos pendentes e indeiscentes, de coloração e formatos variados. Vale ressaltar, entretanto, que USP-CC28 e USP-CC35 representam os morfotipos popularmente conhecidos como ‘Habanero Laranja’ e ‘Biquinho’, para os quais há cultivares melhoradas e comerciais. Já o acesso USP-CC15, pelo contrário, não foi associado a nenhum morfotipo conhecido. Este acesso possui frutos não pungentes de coloração vermelha, formato alongado e superfície enrugada, sendo que tais características morfológicas não se assemelharam a nenhum tipo de pimenta popular ou comercialmente conhecido. Provavelmente, esta linhagem tenha sido originada de uma variedade local desenvolvida por produtores rurais, cuja identificação no banco de germoplasma cedido do IAC (acesso IAC-1598), não constava referências quanto à denominação popular, mas o nome do local onde este acesso foi coletado (Ituiutaba). Diante deste fato, existe a possibilidade de que as maiores taxas de cruzamento encontradas neste genótipo sejam decorrentes de uma menor pressão de seleção para caracteres que favoreçam a autofecundação.

O sistema reprodutivo é uma característica das plantas domesticadas que pode ser modificada pela seleção humana (Meyer *et al.* 2012). Dentre as características envolvidas na domesticação em pimentas, Andrews (1995) destaca a transição do sistema reprodutivo de alogamia para autogamia, com seleção para estilo/estigma mais curtos. Nas pimentas da espécie *C. chinense*, tamanhos variados no tamanho do estilo/estigma são observados. Na caracterização morfológica realizada previamente, os estigmas de USP-CC28 encontram-se na posição inserida em relação às anteras, e provavelmente esta característica está associada à maior taxa de autofecundação apresentada por este acesso. Por outro lado, nos outros dois acessos, os estigmas estão posicionados acima do nível das anteras, sendo o nível de protrusão do acesso USP-CC35 ligeiramente superior que USP-CC15, no entanto, a taxa de cruzamento

do acesso USP-CC35 foi 4,3 vezes menor que USP-CC15. De modo análogo, Tanksley (1984) observou variação na taxa média de polinização natural de 27% a 53% entre linhagens testadoras de *C. annuum*, porém sem diferença significativa na posição do estigma, que se encontravam ligeiramente acima das anteras. Os estigmas expostos são mais propensos a ocorrência de fecundação cruzada, todavia, os resultados do presente estudo sugerem que as variações entre taxas de cruzamento ocorrem independentemente do nível de protrusão do estigma em relação às anteras, podendo outros fatores estarem envolvidos, tal como a sincronia entre a maturação das anteras e do estigma (Luna-Ruiz *et al.* 2018).

O sistema reprodutivo não é fixo para um indivíduo ou população, considerando-se que condições ambientais e características apresentadas pelas plantas influenciam nos processos que governam a reprodução de plantas (Barrett e Harder 2017). Além disso, em condições naturais a taxa de fecundação cruzada ou autofecundação pode variar ao longo das gerações. Dentre as causas comumente elencadas que podem explicar as diferenças nas taxas de cruzamento em diferentes populações de *Capsicum* de uma mesma espécie estão variações na época de plantio, distribuição espacial de plantas, sobreposição do florescimento, densidade populacional de insetos, e compatibilidade genética (Tanksley 1984, Kim *et al.* 2009b, Justino *et al.* 2018).

A polinização cruzada em pimentas ocorre principalmente por insetos polinizadores, podendo ocorrer em menores proporções por agentes abióticos (Raw 2000). Segundo Barrett e Harder (2017), em plantas de sistema misto de reprodução a distribuição da variação na taxa de cruzamento é maior quando a polinização ocorre por animais polinizadores do que por plantas cuja polinização acontece pela água ou vento. Variações na taxa de cruzamento natural em pimenta foram observadas por Campodonico (1983), que avaliou a cultivar Serrano em dois ambientes encontrando taxas médias de 7,46% e 24,95% no Golfo do México e na Costa Pacífica, respectivamente. Essa diferença foi atribuída entre outros fatores, à menor presença de insetos polinizadores no Golfo do México, onde havia menos vegetação, e aplicações de inseticidas mais intensas. Além do efeito ambiental na atividade entomófila, características apresentadas pelas plantas como abundância e tamanho de flores, bem como a composição do néctar podem influenciar na atratividade dos insetos (Rabinowitch *et al.* 1993, Kim *et al.* 2009b).

Os resultados obtidos pelo presente trabalho indicam que as diferenças nas taxas de cruzamento ocorreram predominantemente devido a causas genéticas dado que os tratamentos foram submetidos a condições ambiental e temporal similares, principalmente no que se refere à presença de insetos. Porém, não foi possível definir se tais diferenças são resultantes apenas de características intrínsecas de cada genótipo e/ou de uma interação ambiente-planta-polinizador. Variações dentro de genótipos foram observadas, sendo maiores para o acesso que apresentou maior taxa de cruzamento (USP-CC15), podendo ser indicativo de maior plasticidade do genótipo quanto a variações nos microambientes. Entretanto, o número de repetições foi baixo (3), sendo necessário um número maior para uma melhor precisão da estimativa. O projeto inicial contemplava o número de dez módulos e o envolvimento de mais genótipos. Infelizmente, devido a falhas na germinação das sementes, morte de plantas no campo e baixa produção de frutos (uma das repetições iniciais encontrava-se alocada em uma estufa, porém, as altas temperaturas

internas e/ou não fertilização dos óvulos levaram ao abortamento de flores, resultando em baixa produção de frutos e sementes), o experimento foi conduzido com apenas três repetições e três genótipos. Mesmo assim, foi possível observar variações nas taxas de cruzamento e/ou autofecundações para os genótipos utilizados. Sugere-se que novos estudos sejam realizados, incluindo estudos para outras espécies de pimentas, e com um número maior de repetições (módulos).

3.3.3. Implicações práticas

As taxas de fecundação cruzada variáveis encontradas para *C. chinense*, bem como as relatadas por outros estudos com *Capsicum*, implicam na necessidade de cuidados no planejamento e condução dos programas de melhoramento, multiplicação de germoplasma e produção de sementes comerciais, além do risco inerente ao escape de genes de cultivares geneticamente modificados para as convencionais.

No desenvolvimento de linhagens endogâmicas, bem como para a multiplicação de acessos, em que há limitação de espaço, é necessário o estabelecimento de barreiras físicas que evitem a visitação de insetos, podendo ser utilizados diversas estratégias como o cultivo protegido em casas de vegetação, proteção de plantas individuais com redes, proteção de ramos ou botões florais com sacos de papel, papel alumínio, uso de cola ou outras substâncias para impedir a abertura das flores (Bosland 1993, Cauich *et al.* 2006, Rêgo *et al.* 2012, Rodrigues *et al.* 2016). Em campos comerciais de produção de sementes, geralmente recomenda-se o isolamento por distância ou uso de bordaduras, aliado a uma maior densidade de plantas do genótipo de interesse que tende a aumentar o suprimento do pólen desejado, diminuindo a probabilidade de contaminação por fluxo gênico indesejado (Justino 2013).

Apesar de cruzamentos espontâneos serem indesejados no cultivo comercial, o aparecimento de plantas atípicas são fontes de variabilidade, importantes para o melhoramento genético. Dentre as vantagens das espécies que apresentam sistema reprodutivo misto, como *C. chinense*, é a possibilidade de serem conduzidas nos programas de melhoramento tanto como autógamas como alógamas. Vale destacar que no Brasil, a maioria das cultivares de pimenta ainda é oriunda de polinização aberta (Ribeiro e Reifschneider 2016), e no melhoramento de populações mistas, um número maior de gerações de reprodução natural é necessário para que o sistema reprodutivo esteja em equilíbrio, quando comparado às populações alógamas (Vencovsky *et al.* 2001).

REFERÊNCIAS

- Ahmed N e Tanki MI (1994) Effect of planting distance and direction on natural cross pollination and their role in seed production of pepper (*Capsicum annuum*). Turin, Italy, p. 94–96. In Belletti P e Quagliotti L (orgs) ***Capsicum & Eggplant Newsletter* 13.**
- Aleemullah M, Haigh AM e Holford P (2000) Anthesis, anther dehiscence, pistil receptivity and fruit development in the Longum group of *Capsicum annuum*. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 40: 755–762.
- Allard RW (1971) **Princípios do melhoramento genético das plantas.** Edgard Blucher, São Paulo, 381p.

- Andrews J (1995) **Peppers: the domesticated *Capsicum***. University of Texas Press, Austin, 186p.
- Barrett SCH e Harder LD (2017) The ecology of mating and its evolutionary consequences in seed plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 48**: 135–157.
- Bosland PW (1993) An effective plant field cage to increase the production of genetically pure Chile (*Capsicum* spp.) seed. **HortScience 28**: 1053.
- Campodonico OP (1983) Estimates of natural cross-pollination in Serrano pepper (*Capsicum annuum* L.). Turin, Italy, p. 113–115. In ***Capsicum Newsletter 2***.
- Carvalho SIC de, Bianchetti L de B, Ribeiro CS da C e Lopes CA (2006) **Pimentas do Gênero *Capsicum* no Brasil**. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 27p.
- Cauch O, Quezada Euán JJG, Ramírez VM, Valdovinos-Nuñez GR e Moo-Valle H (2006) Pollination of habanero pepper (*Capsicum chinense*) and production in enclosures using the stingless bee *Nannotrigona perilampoides*. **Journal of Apicultural Research 45**: 125–130.
- Costa LV, Lopes MTG, Lopes R e Alves SRM (2008) Polinização e fixação de frutos em *Capsicum chinense* Jacq. **Acta Amazonica 38**: 361–364.
- Cruz DDO e Campos LADO (2008) Biologia floral e polinização de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L., Solanaceae): um estudo de caso. **Acta Scientiarum. Biological Sciences 29**: 375–379.
- Djian-Caporalino C, Lefebvre V, Sage-Daubèze A-M e Palloix A (2006) *Capsicum*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 185–244. In Singh RJ (org) **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Volume 3. Vegetable Crops**.
- Heiser Jr. CB (1976) Peppers *Capsicum* (Solanaceae). Longman, London, p. 265–268. In Simmond NW (org) **Evolution of crop plants**.
- Horneburg B e Becker HC (2018) Spontaneous outcrossing in tomato depends on cultivar and environment and varies between individual flowers. **Plant Breeding**.
- Jarret RL e Berke T (2008) Variation for fruit morphological characteristics in a *Capsicum chinense* Jacq. germplasm collection. **HortScience 43**: 1694–1697.
- Justino E, Fonseca M, Ferreira M, Boiteux L, Silva P e Nascimento W (2018) Estimate of natural cross-pollination rate of *Capsicum annuum* using a codominant molecular marker associated with fruit pungency. **Genetics & Molecular Research 17**: 1–9.
- Justino EV (2013) Maturação fisiológica e taxa de cruzamento natural na produção de sementes de *Capsicum*. Universidade de Brasília, 128p.
- Kim C-G, Kim DI, Kim H-J, Park JE, Lee B, Park KW, Jeong S-C, Choi KH, An JH, Cho K-H, Kim YS e Kim HM (2009) Assessment of gene flow from genetically modified anthracnose-resistant chili pepper (*Capsicum annuum* L.) to a conventional crop. **Journal of Plant Biology 52**: 251–258.
- Kim C-G, Park KW, Lee B, Kim DI, Park J-Y, Kim H-J, Park JE, An JH, Cho K-H, Jeong S-C, Choi KH, Harn CH e Kim HM (2009) Gene flow from genetically modified to conventional chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant Science 176**: 406–412.
- Luna-Ruiz J de J, Nabhan GP e Aguilar-Meléndez A (2018) Shifts in plant chemical defenses of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) due to domestication in Mesoamerica. **Frontiers in Ecology and Evolution 6**: 1–12.
- Luz FJ de F (2007) Caracterizações morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.). Universidade Estadual Paulista, 70p.

- Meyer RS, DuVal AE e Jensen HR (2012) Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. **New Phytologist** **196**: 29–48.
- Odland ML e Porter AM (1941) A study of natural crossing in peppers (*Capsicum frutescens*). **American Society for Horticultural Science** 585–588.
- Pereira R de CA, Crisóstomo JR, Rosseti AG e Santos OG dos (2014) Avaliação de progênes de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.) no Ceará. **Horticultura Brasileira** **31**: 1479–1486.
- Pickersgill B (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica** **96**: 129–133.
- Pickersgill B (1971) Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). **Evolution** **25**: 683.
- Rabinowitch HD, Fahn A, Meir T e Lensk Y (1993) Flower and nectar attributes of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants in relation to their attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.). **Annals of Applied Biology** **123**: 221–232.
- Raw A (2000) Foraging behaviour of wild bees at hot pepper flowers (*Capsicum annuum*) and its possible influence on cross pollination. **Annals of Botany** **85**: 487–492.
- Rêgo ER do, Nascimento MF, Nascimento NFF do, Santos RMC dos, Fortunato FLG e Rêgo MM do (2012) Comparação de métodos para a produção de frutos autofecundados em pimenteiros ornamentais. **Horticultura Brasileira** **30**: 669–672.
- Rêgo ER, Finger FL, Bolsista NFN, Araújo ER e Sapucay MJLC (2011) Genética e melhoramento de pimenteiros *Capsicum* spp. Imprima, Recife, p. 117–135. In Rêgo ER, Finger FL, e Rêgo MM (orgs) **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp.)**.
- Ribeiro CSC e Reifschneider FJB (2016) A snapshot of hot pepper cultivars in Brazil - challenges and opportunities for breeding programs. Trujillo, Peru. In **23rd International Pepper Conference - Book of Abstracts**.
- Rodrigues R, Bento C dos S, Pimenta S e Sudré CP (2016) Melhoramento de Pimentão e Pimenta. UFV, Viçosa, MG, p. 464. In Nick C e Borém A (orgs) **Melhoramento de Hortaliças**.
- Serrano AR e Guerra-Sanz JM (2006) Quality fruit improvement in sweet pepper culture by bumblebee pollination. **Scientia Horticulturae** **110**: 160–166.
- Shifriss C (1997) Male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Euphytica** **93**: 83–88.
- Tanksley SD (1984) High rates of cross-pollination in chile pepper. **HortScience (USA)** **19**: 580–582.
- Valls JFM (2007) Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. EMBRAPA, Brasília, DF, p. 281–305. In Nass LL (org) **Recursos Genéticos Vegetais**.
- Vasconcelos CS de, Barbieri RL, Neitzke RS, Priori D, Fischer SZ e Mistura CC (2012) Determinação da dissimilaridade genética entre acessos de *Capsicum chinense* com base em características de flores. **Revista Ceres** **59**: 493–498.
- Vencovsky R, Pereira MB, Crisóstomo JR e Ferreira MAJ (2001) Genética e melhoramento de populações mistas. Fundação MT, p. 231–281. In Nass LL, Valois ACC, Melo SI, e Valadaresinglis MC (orgs) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**.

4. CONCLUSÕES

- A caracterização morfoagronômica foi essencial para o conhecimento da diversidade disponível no banco de germoplasma de pimentas, além disso forneceu informações que foram necessárias para a estimativa da taxa de cruzamento da espécie *C. chinense*.
- Alta variabilidade morfoagronômica foi observada em 40 acessos de pimentas (34 *C. chinense*, 4 *C. annuum* e/ou *C. frutescens* e 2 *C. baccatum*) do banco de germoplasma da ESALQ/USP.
- Este estudo se configura como o primeiro referente à taxa de cruzamento para a espécie *C. chinense*, a qual demonstrou possuir sistema reprodutivo misto com taxas de cruzamento de 0% a 40,6% que variaram principalmente conforme o genótipo.
- A metodologia desenvolvida com base em marcadores morfológicos foi eficiente para quantificar as taxas de cruzamento natural e determinar a direção do cruzamento entre três acessos de *C. chinense*. A metodologia também permite adaptações para investigações mais detalhadas sobre os fatores que influenciam o sistema reprodutivo.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Caracterização dos 40 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) para 13 descritores

Acesso	Hábito de crescimento	Forma da folha	Altura da planta	Cor da antera	Posição do estigma	Mancha na corola	Constricção anelar no cálice	Cor do fruto maduro	Forma do fruto	Superfície do fruto	Forma do ápice do fruto	Pungência	Dias para floração
CC01	5-Intermediário	2-Ovalada	3-Média	3-Azul pálido	7-Acima	Ausente	Presente	13-Amarelo-limão	1-Alongado	3-Enrugada	1-Pontiagudo	Presente	98
CC02	6-Levemente ereto	2-Ovalada	3-Média	5-Roxo	6-Levemente acima	Ausente	Presente	10-Roxo	1-Alongado	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	91
CC03	7-Ereto	1-Deltóide	4-Alta	5-Roxo	6-Levemente acima	Ausente	Presente	5-Salmão	4-Campanulado	2-Semienrugada	3-Afundado	Presente	95
CC04	5-Intermediário	2-Ovalada	4-Alta	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Presente	5-Salmão	1-Alongado	3-Enrugada	1-Pontiagudo	Presente	98
CC05	5-Intermediário	3-Lanceolada	2-Baixa	5-Roxo	5-Mesmo nível	Ausente	Presente	8-Vermelho	1-Alongado	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	74
CC06	7-Ereto	1-Deltóide	4-Alta	5-Roxo	6-Levemente acima	Ausente	Presente	5-Salmão	4-Campanulado	2-Semienrugada	3-Afundado	Presente	106
CC07	5-Intermediário	2-Ovalada	3-Média	2-Amarela	7-Acima	Ausente	Presente	13-Amarelo-limão	1-Alongado	3-Enrugada	1-Pontiagudo	Presente	92
CC08	5-Intermediário	2-Ovalada	4-Alta	3-Azul pálido	7-Acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	2-Arredondado	1-Lisa	2-Arredondado	Presente	101
CC09	6-Levemente ereto	2-Ovalada	3-Média	5-Roxo	5-Mesmo nível	Ausente	Presente	10-Roxo	1-Alongado	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	84
CB10	6-Levemente ereto	1-Deltóide	4-Alta	2-Amarela	5-Mesmo nível	Presente	Ausente	6-Laranja	1-Alongado	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	83
CC11	5-Intermediário	1-Deltóide	4-Alta	4-Azul	5-Mesmo nível	Ausente	Presente	5-Salmão	3-Triangular	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Ausente	99
CC12	7-Ereto	2-Ovalada	4-Alta	4-Azul	6-Levemente acima	Ausente	Presente	5-Salmão	4-Campanulado	2-Semienrugada	3-Afundado	Presente	103
CC13	6-Levemente ereto	2-Ovalada	3-Média	5-Roxo	5-Mesmo nível	Ausente	Presente	10-Roxo	1-Alongado	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	81
CC14	5-Intermediário	1-Deltóide	3-Média	3-Azul pálido	7-Acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	1-Alongado	1-Lisa	1-Pontiagudo	Ausente	85

Acesso	Hábito de crescimento	Forma da folha	Altura da planta	Cor da antera	Posição do estigma	Mancha na corola	Constrição anelar no cálice	Cor do fruto maduro	Forma do fruto	Superfície do fruto	Forma do ápice do fruto	Pungência	Dias para floração
CC15	5-Intermediário	1-Deltóide	3-Média	4-Azul	6-Levemente acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	1-Alongado	3-Enrugada	1-Pontiagudo	Ausente	95
CC16	5-Intermediário	2-Ovalada	4-Alta	4-Azul	6-Levemente acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	3-Triangular	4-Rugosa	1-Pontiagudo	Presente	102
CC17	5-Intermediário	3-Lanceolada	3-Média	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Ausente	8-Vermelho	1-Alongado	1-Lisa	1-Pontiagudo	Presente	71
CC18	5-Intermediário	2-Ovalada	4-Alta	5-Roxo	6-Levemente acima	Ausente	Presente	11-Marrom	3-Triangular	4-Rugosa	1-Pontiagudo	Presente	103
CC19	5-Intermediário	2-Ovalada	5-Muito alta	5-Roxo	6-Levemente acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	1-Alongado	4-Rugosa	1-Pontiagudo	Presente	98
CC20	6-Levemente ereto	2-Ovalada	4-Alta	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Ausente	8-Vermelho	1-Alongado	1-Lisa	1-Pontiagudo	Presente	83
CC21	5-Intermediário	2-Ovalada	4-Alta	5-Roxo	6-Levemente acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	3-Triangular	4-Rugosa	1-Pontiagudo	Presente	108
CC22	6-Levemente ereto	3-Lanceolada	3-Média	4-Azul	7-Acima	Ausente	Ausente	8-Vermelho	1-Alongado	1-Lisa	1-Pontiagudo	Presente	78
CC23	5-Intermediário	1-Deltóide	3-Média	5-Roxo	3-Inserido	Ausente	Presente	8-Vermelho	5-Retangular	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	98
CC24	5-Intermediário	2-Ovalada	4-Alta	5-Roxo	3-Inserido	Ausente	Presente	6-Laranja	5-Retangular	2-Semienrugada	3-Afundado	Presente	91
CC25	7-Ereto	2-Ovalada	5-Muito alta	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Ausente	8-Vermelho	1-Alongado	1-Lisa	1-Pontiagudo	Presente	110
CC27	3-Prostrado	3-Lanceolada	2-Baixa	5-Roxo	5-Mesmo nível	Ausente	Presente	2-Amarelo	1-Alongado	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	71
CC28	5-Intermediário	2-Ovalada	2-Baixa	5-Roxo	3-Inserido	Ausente	Presente	6-Laranja	5-Retangular	2-Semienrugada	3-Afundado	Presente	88
CB34	7-Ereto	1-Deltóide	5-Muito alta	2-Amarela	7-Acima	Presente	Ausente	8-Vermelho	3-Triangular	2-Semienrugada	3-Afundado	Presente	100
CC35	3-Prostrado	1-Deltóide	2-Baixa	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	3-Triangular	1-Lisa	1-Pontiagudo	Ausente	88

Acesso	Hábito de crescimento	Forma da folha	Altura da planta	Cor da antera	Posição do estigma	Mancha na corola	Construção anelar no cálice	Cor do fruto maduro	Forma do fruto	Superfície do fruto	Forma do ápice do fruto	Pungência	Dias para floração
CC36	4-Levemente Prostrado	2-Ovalada	3-Média	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Presente	2-Amarelo	3-Triangular	1-Lisa	2-Arredondado	Presente	98
CC37	3-Prostrado	1-Deltóide	2-Baixa	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Presente	4-Amarelo-laranja	3-Triangular	1-Lisa	1-Pontiagudo	Ausente	78
CC38	3-Prostrado	1-Deltóide	2-Baixa	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	3-Triangular	1-Lisa	1-Pontiagudo	Ausente	88
CC39	7-Ereto	1-Deltóide	4-Alta	5-Roxo	6-Levemente acima	Ausente	Presente	6-Laranja	2-Arredondado	1-Lisa	2-Arredondado	Presente	88
CC40	5-Intermediário	1-Deltóide	3-Média	5-Roxo	3-Inserido	Ausente	Presente	11-Marrom	5-Retangular	2-Semienrugada	3-Afundado	Presente	97
CC41	5-Intermediário	1-Deltóide	3-Média	5-Roxo	5-Mesmo nível	Ausente	Presente	5-Salmão	3-Triangular	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Ausente	104
CC42	4-Levemente Prostrado	2-Ovalada	3-Média	2-Amarela	7-Acima	Ausente	Presente	2-Amarelo	3-Triangular	1-Lisa	2-Arredondado	Presente	92
CC43	5-Intermediário	3-Lanceolada	4-Alta	5-Roxo	7-Acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	1-Alongado	3-Enrugada	1-Pontiagudo	Presente	85
CC44	7-Ereto	1-Deltóide	4-Alta	3-Azul pálido	5-Mesmo nível	Ausente	Presente	8-Vermelho	4-Campanulado	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	97
CC46	5-Intermediário	1-Deltóide	3-Média	5-Roxo	6-Levemente acima	Ausente	Presente	8-Vermelho	5-Retangular	3-Enrugada	3-Afundado	Presente	91
CC47	5-Intermediário	2-Ovalada	2-Baixa	5-Roxo	3-Inserido	Ausente	Presente	6-Laranja	5-Retangular	2-Semienrugada	1-Pontiagudo	Presente	98