

USO DE MARCADORES ISSR PARA ESTIMAR A DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE PIMENTA COLETADOS NO SUL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Francielle Lorençon Oliveira

Graduanda em Ciências Biológicas/Laboratório de Biologia Molecular/Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo Campus Alegre/IFES/ES
franciellelorencon@hotmail.com

Monique Moreira Moulin

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas/Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal/UENF/RJ
Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo Campus Alegre/IFES/ES
moniquemoulin@gmail.com

Paola Alvares Bianchi

Graduanda em Ciências Biológicas/Laboratório de Biologia Molecular/Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo Campus Alegre/IFES/ES
pahbianchi@hotmail.com

Samy Pimenta

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas/Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal/UENF/RJ
samypimenta@bol.com.br

Rosana Rodrigues

Doutora em Produção Vegetal/Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal/UENF/RJ
Docente da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/UENF/RJ
rosana@uenf.br

Recebido: 31 de maio de 2013. Revisado: 26 de agosto de 2013. Aceito: 04 de setembro de 2013.
Publicado *online*: 03 de outubro de 2013.

RESUMO

A modernização da agricultura e o conseqüente abandono da atividade agrícola têm provocado a perda de diversidade genética de culturas como a pimenta. As atividades de coleta e caracterização do germoplasma permitem conhecer variedades tradicionais de uma determinada região e contribuem para minimizar a perda da diversidade genética. O objetivo deste trabalho foi caracterizar, por intermédio de marcadores moleculares, plantas de pimenta obtidos em propriedades rurais e estabelecimentos comerciais da região Sul do Estado do Espírito Santo. Foram utilizados onze iniciadores, que amplificaram 144 bandas, das quais 96 foram polimórficas e 48 monomórficas. A análise dos dados foi efetuada com o uso do Programa Genes e o agrupamento foi gerado com o método UPGMA. A técnica molecular foi eficiente para estimar a variabilidade genética entre os acessos, com correlação cofenética de 0,92. Os acessos foram considerados distintos, o que demonstra que os agricultores tradicionais da região Sul do Estado do Espírito Santo detêm genótipos de pimenta com expressiva diversidade genética. Não foi observada correlação entre distância genética e a distância geográfica, o que pode ser reflexo da prática comum de trocas de sementes de pimenta entre os produtores rurais, configurando uma ampla variabilidade genética.

Palavras-chave: Marcadores Moleculares; Recursos Genéticos; Variabilidade Genética.

ABSTRACT

The modernization of agriculture and the consequent abandonment of agricultural activity have caused genetic diversity loss of crops like pepper. Collection activities and germplasm characterization allow to

know traditional varieties of a particular region and contribute to minimize the genetic diversity loss. This study characterizes, through molecular markers, pepper plants obtained from rural properties and shops from southern Espírito Santo state. It was used eleven primers that amplified 144 bands, which 96 were polymorphic and 48 monomorphic. The data analysis was based on Genes Program and clustering was done with UPGMA method. The molecular technique was efficient to estimate the genetic variability among the accesses, with cophenetic correlation coefficients (CCC) of 0.92. The accesses were considered distinct, which demonstrates that the traditional agriculturists in southern Espírito Santo hold pepper genotypes with significant genetic diversity. No correlation was observed between genetic distance and geographic distance, which may be a reflection of the common practice of exchanging pepper seeds among farmers, setting up a large genetic variability.

Keywords: Molecular Markers, Genetic Resources, Genetic Variability.

1. INTRODUÇÃO

As pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) são amplamente cultivadas em todo mundo e ocupam uma importante posição no mercado brasileiro de hortaliças destacando-se entre as dez de maior consumo, tanto em valor, quanto em volume comercializado (Cezar et al., 2009). Ainda em termos de Brasil, o gênero *Capsicum* possui importância econômica, biológica e cultural, o que se caracteriza pelos múltiplos usos do fruto na culinária das diversas regiões brasileiras (Sudré et al., 2010).

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae, e tem 31 espécies já identificadas, cinco delas cultivadas (*C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, e *C. pubescens*), sendo estas de grande importância econômica como alimento e especiaria (Moscone et al., 2007). O Brasil é considerado o centro de diversidade secundária do gênero *Capsicum*, entretanto sua variabilidade genética é pouco conhecida e pesquisada para a grande maioria das espécies (Sudré et al., 2010).

Muitos genótipos de diversas culturas foram perdidos ao longo do tempo, em consequência da substituição ou do desaparecimento de espécies silvestres, cultivares obsoletas e cultivares locais. A agricultura familiar tem assegurado o uso de práticas de conservação de diversas variedades locais, como as de pimenta. Comunidades rurais podem contribuir para o uso e conservação de germoplasma adaptado as comunidades agrícolas (Almekinders e Elings, 2001).

As atividades relacionadas aos recursos genéticos (coleta, caracterização, multiplicação, documentação e conservação) assumem fundamental importância para otimizar o uso imediato desses recursos em programas de melhoramento. Por isso, torna-se fundamental realizar a coleta e a conservação adequada desse germoplasma e mantê-lo em coleções organizadas procedendo-se a sua caracterização, avaliação e documentação (Cabral et al., 2010). No Estado do Espírito Santo não há registros sobre coleta, caracterização e conservação desse recurso genético em bancos de germoplasma, o que ressalta a importância do estudo, coletas e conservação apropriada de pimentas na região.

Nos acessos de germoplasma podem ser encontradas fontes de variabilidade genética para a obtenção de genótipos de interesse. A caracterização da variação genética e filogenética do germoplasma de uma cultura é o requisito básico no melhoramento de plantas (Patel et al., 2011). Segundo Valois et al., (2001) a caracterização pode ser morfológica, fenotípica, reprodutiva, bioquímica, citogenética ou molecular. Com o uso de marcadores moleculares, pode-se gerar uma grande quantidade de informações que, associada às características fenotípicas, permitem o agrupamento de genótipos, e o planejamento de cruzamentos de forma rápida e muito eficiente (Spooner et al., 2005).

O potencial de uso dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se a identificação de genótipos, quantificação da variabilidade genética, estudos de diversidade e distância genética. Na avaliação da diversidade genética, destacam-se os marcadores moleculares, pois, quando comparados com outros tipos de marcadores, apresentam maior número de locos polimórficos, o que permite a distinção entre acessos, mesmo com morfologia similar (Moulin et al., 2012).

A técnica de Sequências Simples Repetitivas Internas (ISSR) vem sendo empregada como um importante marcador molecular para a diferenciação rápida entre indivíduos, devido ao elevado grau de polimorfismo e baixo custo (Borba et al., 2005). O método ISSR tem como vantagem ser um marcador altamente reprodutível, sem qualquer necessidade de informações prévias de sequência para análises genéticas (Kumar et al., 2011). Recentes estudos da variabilidade genética em *Capsicum* utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR podem ser encontrados na literatura (Dias et al., 2013; Ahmed 2013; Patel et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivos: coletar variedades locais de pimenta em propriedades rurais e estabelecimentos comerciais da região Sul do Estado do Espírito Santo e caracterizar os acessos coletados quanto a variabilidade genética por intermédio de marcadores moleculares do tipo ISSR.

2. METODOLOGIA

Foram realizadas seis viagens de coleta de pimenta no Sul do Estado do Espírito Santo, compreendendo 20 propriedades rurais e 10 estabelecimentos comerciais. Foram coletados 30 acessos de pimenta nos municípios de Alegre, Venda Nova do Imigrante e Cachoeiro do Itapemirim (Tabela 1). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, no viveiro do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre. As sementes dos frutos coletados foram plantados em sacos plásticos de 5L. Todas as pimentas coletadas pertencem a espécie *C. annuum*.

Tabela 1: Número de registro, local de coleta e procedência dos 30 acessos de *Capsicum* spp. da coleção de germoplasma do IFES, Campus de Alegre.

Número IFES	Local de coleta	Procedência
IFES 01	Propriedade rural	Alegre
IFES 02	Propriedade rural	Alegre
IFES 03	Propriedade rural	Alegre
IFES 04	Propriedade rural	Alegre
IFES 05	Propriedade rural	Alegre
IFES 06	Propriedade rural	Alegre
IFES 07	Propriedade rural	Alegre
IFES 08	Propriedade rural	Alegre
IFES 09	Propriedade rural	Alegre
IFES 10	Propriedade rural	Alegre
IFES 11	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante
IFES 12	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante
IFES 13	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante
IFES 14	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante
IFES 15	Estabelecimento comercial	Cachoeiro de Itapemirim
IFES 16	Estabelecimento comercial	Cachoeiro de Itapemirim
IFES 17	Estabelecimento comercial	Cachoeiro de Itapemirim
IFES 18	Estabelecimento comercial	Cachoeiro de Itapemirim
IFES 19	Estabelecimento comercial	Cachoeiro de Itapemirim
IFES 20	Estabelecimento comercial	Alegre
IFES 21	Estabelecimento comercial	Alegre
IFES 22	Estabelecimento comercial	Venda Nova do Imigrante
IFES 23	Estabelecimento comercial	Venda Nova do Imigrante
IFES 24	Estabelecimento comercial	Venda Nova do Imigrante
IFES 25	Estabelecimento comercial	Venda Nova do Imigrante
IFES 26	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante
IFES 27	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante
IFES 28	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante
IFES 29	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante
IFES 30	Propriedade rural	Venda Nova do Imigrante

Após 20 dias de plantio foi efetuada a coleta de 3,0 gramas de folhas jovens para extração de DNA. As folhas foram armazenadas em papel alumínio e imersas em gelo para que não houvesse a degradação do DNA. A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e as demais análises moleculares foram efetuadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre.

2.1 Extração do DNA

Cerca de 300 mg de tecido macerado foi transferido para tubos de 1,5 mL e imersos em N₂ líquido para a extração de DNA de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com modificações, descritas a seguir.

Foram adicionados aos tubos contendo as amostras 1 mL do tampão de extração pré-aquecido contendo 2 % CTAB, 1,4 mol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 1 % PVP e 0,2 % β- mercaptoetanol. Em seguida, foi adicionado 5 µL de proteinase K (10 mg mL⁻¹) em cada uma das amostras. Este material foi incubado a 37°C por 30 minutos e agitado suavemente a cada 10 minutos, e posteriormente incubado a 65°C por mais 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 g durante 10 minutos. O sobrenadante (cerca de 800 µl) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado e adicionado igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), para se efetuar a desproteinização. Foram realizadas suaves inversões do material durante aproximadamente 10 minutos até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugação, a 8000 g por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e em seguida, 200 µL de NaCl a 2,0 mol L⁻¹ contendo 4 % de PEG foi adicionado, para remoção completa de proteínas e recuperação do DNA, sendo as amostras incubadas por 15 minutos a 4°C. O material foi centrifugado a 8000 g por 10 minutos. Os ácidos nucléicos foram precipitados pela adição de dois terços (400 µl) do volume de isopropanol gelado, e incubados por 20 minutos a -70 °C. O precipitado foi sedimentado por centrifugação, a 8000 g por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 200 µl etanol a 75 % com acetato de amônio, para retirada de sal presente (entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 8000 g durante 5 minutos). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais, até que o etanol estivesse removido. Em seguida, o material foi ressuspensionado em 100 µl de solução TE (Tris-EDTA – 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0) com RNase em uma concentração final de 10 µg mL⁻¹ e incubado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Logo após, o material foi armazenado a -20 °C até o uso.

2.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada em géis de agarose 2,0 %, sendo a concentração das bandas determinada pelo Programa *Image*, utilizando-se como padrão um marcador de 250 pb. Posteriormente o DNA foi diluído (5 ng. µL⁻¹) para as reações de polimerase em cadeia (PCR).

2.3 Marcadores ISSR

Efetuiu-se uma triagem de iniciadores que fossem capazes de detectar polimorfismo. Para esta verificação foram previamente selecionados quatro acessos divergentes em campo (IFES 04, IFES 07, IFES 16 e IFES23). Considerando-se os quatro acessos, foram testados 26 iniciadores selecionando-se como polimórficos os iniciadores: (AG)₈YT, (AC)₈CG, (AC)₈CT, (AC)₈YG, (CT)₈RG, (GGAT)₃GA, (GAA)₆AA, (AG)₈C, (CT)₈G, (AC)₈T e (AG)₈C.

2.4 Condições de Amplificação

As reações de amplificação foram completadas para um volume final de 19 μL , contendo os seguintes reagentes: 10 mmol L^{-1} Tris HCl, pH 8,3; 50 mmol L^{-1} KCl; 2,4 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 100 μM de cada um dos dNTP; 0,4 μM de oligonucleotídeos iniciadores; 5 ng de DNA genômico; 5 ng de DNA genômico e 0,75 unidade de Taq DNA polimerase. Foram aplicadas 2 μL de DNA, e posteriormente adicionado o mix descrito anteriormente.

As reações de PCR (termociclador modelo Eppendorf) foram conduzidas da seguinte forma: 3 min a 94°C para desnaturação inicial, seguindo-se os 40 ciclos, cada um consistiu de 94°C por 1 min, 40-55°C por 1 min (dependendo do iniciador utilizado), 72°C por 3 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram então separados em gel de agarose 1,5%, corados com gel red, e submetidos à luz UV para visualização dos resultados (Fotodocumentador Minibis Pro – Bio-imaging System). As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

2.5 Análise estatística

Foi elaborada uma matriz de dados binários correspondente à presença (1) ou ausência (0) das bandas. Para formação da matriz de dissimilaridade foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard. A análise de todos os dados foi feita pelo Programa Genes (Cruz, 2006), com exceção dos dendrogramas que foram obtidos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*), e gerados com o auxílio do Programa R (www.r-project.org).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 26 iniciadores foi testado. Destes onze tiveram suas temperaturas de anelamento otimizadas (Tabela 2), sendo selecionados e avaliados quanto ao número de bandas geradas e ao polimorfismo verificado para estas bandas. Os demais iniciadores foram descartados, pois não houve uma eficiente produção de bandas.

Tabela 2: Iniciadores de ISSR utilizados, temperaturas de anelamento otimizadas para o estudo da diversidade genética entre 30 acessos de pimenta coletados no Sul do Estado do Espírito Santo.

Sequência 5' – 3'	Temperatura de anelamento	Bandas Polimórficas	Bandas Monomórficas	Total de Bandas
(AG) ₈ YT	42°C	7	5	12
(AC) ₈ CG	55°C	3	11	14
(AC) ₈ CT	47°C	12	2	14
(AC) ₈ YG	40°C	9	3	12
(CT) ₈ RG	42°C	13	0	13
(GGAT) ₃ GA	41°C	10	1	11
(GAA) ₆ AA	48°C	5	8	13
(AG) ₈ C	45°C	6	7	13
(CT) ₈ G	44°C	11	4	15
(AC) ₈ T	50°C	10	4	14
(AG) ₈ C	50°C	10	3	13
Total		96	48	144

R= A,G; Y=C,T

Detectou-se diversidade genética entre os acessos de pimenta estudados com base na técnica do ISSR, conforme já descrito em outros trabalhos com pimenta (Patel et al., 2011; Thul et al., 2011; Ahmed 2013; Dias et al., 2013), sendo a correlação cofenética observada de 0,92. Estima-se que houve um bom

ajuste entre as distâncias, pois de acordo com Sokal e Rohlf (1995), o ajuste adequado é avaliado pelos valores de correlação cofenética superiores a 0,80. Ahmed (2013) analisando seis acessos de pimenta com dez iniciadores ISSR obtiveram uma correlação cofenética com uma boa correspondência ao deste trabalho (CCC: 0,88).

Foi obtido um total de 144 bandas, sendo 96 polimórficas e 48 monomórficas. O número médio de fragmentos polimórficos produzidos por iniciador foi de 8,7. O iniciador mais polimórfico foi o (CT)₈RG (Figura 1), gerando treze bandas, seguido pelo iniciador (AC)₈CT, que gerou doze bandas polimórficas. Ahmed (2013) obteve um total de 87 bandas, sendo 52 polimórficas e 35 monomórficas, sendo o número médio de fragmentos polimórficos de 4,7 por iniciador, inferior ao obtido neste trabalho.

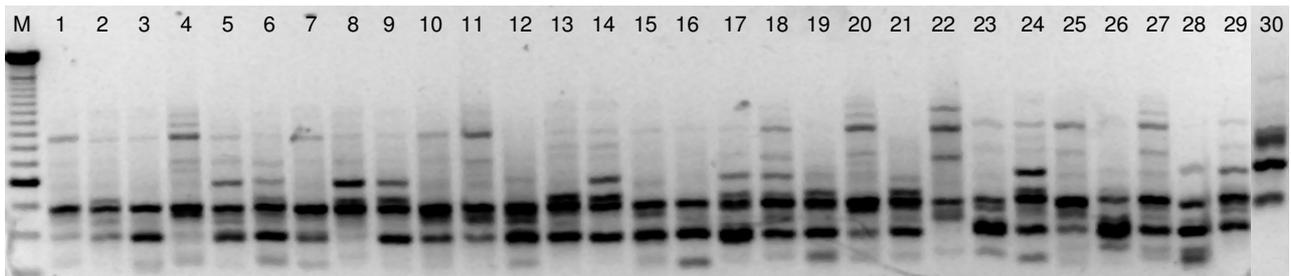


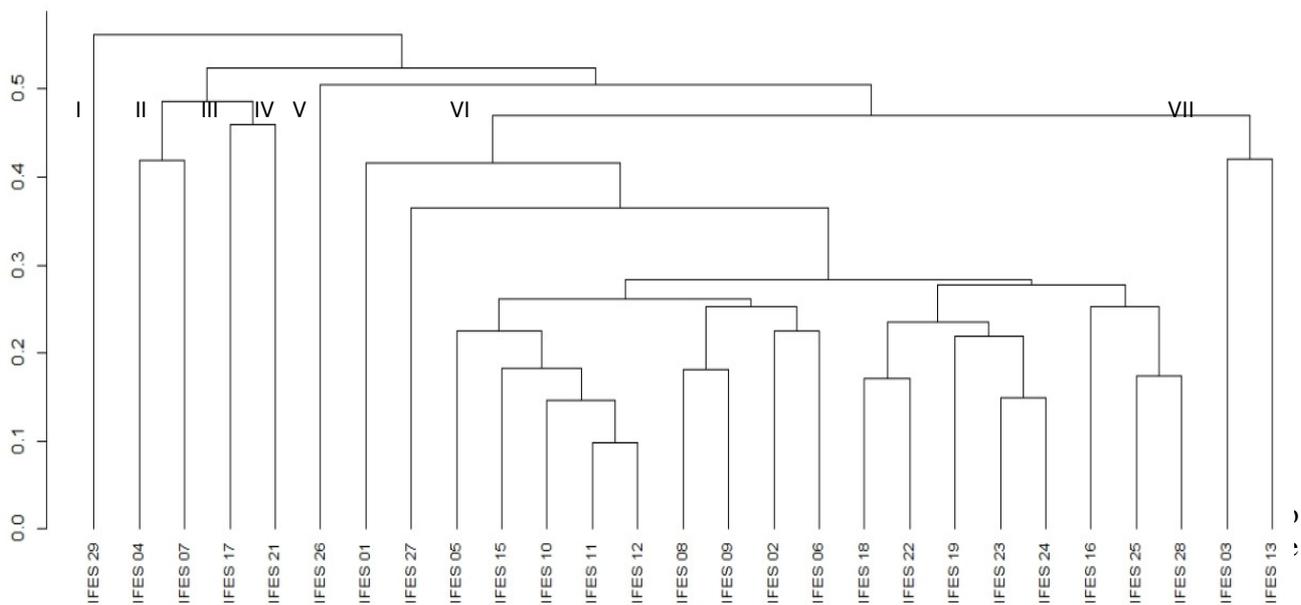
Figura 1: Perfil de um gel de ISSR utilizando o iniciador (CT)₈RG para os 30 acessos de pimenta coletados no Sul do e Estado do Espírito Santo.

Resultados divergentes foram obtidos por Dias et al., (2013), neste trabalho foi obtido um total de 364 bandas, sendo 323 polimórficas e 41 monomórficas, e número médio de fragmentos polimórficos foi de 12,4 por iniciador. Entretanto, estes autores caracterizaram quatro diferentes espécies de pimenta e foi utilizado um acesso de tomate como testemunha, o que justifica o elevado polimorfismo obtido devido a divergência entre as espécies. Costa et al., (2009) utilizando oito marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) obtiveram 10,5 bandas polimórficas por iniciador, no entanto o trabalho também utilizou diferentes espécies. No presente trabalho todos os acessos coletados são da espécie *C. annuum*.

Uma série de bandas específicas foram encontradas para os diferentes genótipos, o que ressalta a variabilidade genética encontrada nos genótipos coletados no Sul do Estado do Espírito Santo, o que corrobora com resultados obtidos em outros trabalhos com pimenta (Refaat et al., 2007; Patel et al., 2011). Todos os acessos foram considerados distintos, não sendo observadas duplicatas. A ocorrência de duplicatas não identificadas em bancos de germoplasma encarece e dificulta a manutenção adequada do material, gerando problemas relacionados à organização e ao acesso de usuários potenciais ao recurso genético (Gonçalves et al., 2008). Thul et al., (2011) trabalhando com 22 acessos de pimenta caracterizados por 13 iniciadores ISSR também não detectaram duplicatas em seu banco de germoplasma, o que revela elevado polimorfismo nos acessos estudados. Trabalhando com a diversidade genética baseada em marcadores moleculares RAPD Costa et al., (2009) detectaram uma série de duplicatas em um estudo com 52 acessos de *Capsicum* spp, o que dificulta o estudo das características.

Utilizando a matriz de Jaccard, identificou-se como mais distantes os acessos IFES 11 e IFES 29, com distância de 0,42, enquanto os acessos IFES 11 e IFES 12 foram os mais similares, com distância de 0,03. A distância média observada entre os acessos foi de 0,22 ($\pm 0,04$).

Foi obtido um dendrograma pelo método UPGMA e feito um corte a 43% (0,43) de distância, que resultou na formação de sete grupos principais (Figura 2). Os grupos I, III, IV e V foram constituídos por apenas um acesso, IFES 29, IFES 17, IFES 21 e IFES 26 respectivamente. O grupo II reuniu os acessos IFES 04 e IFES 07. O grupo VI foi constituído pelo maior número de acessos, totalizando 19 acessos. O grupo VII foi composto pelos acessos IFES 03 e IFES 13.



Por intermédio do marcador ISSR, não houve correlação entre as distâncias geográficas e genéticas, estando dentro de um mesmo grupo acessos coletados em diferentes municípios e propriedades rurais localizadas em pontos distantes. A falta de correlação entre as distâncias geográficas e morfológicas pode estar relacionada ao intenso intercâmbio de pimenta entre os agricultores e ao tempo que cada família cultiva a mesma variedade.

Os resultados obtidos por meio da análise discriminante, considerando as diferentes origens dos acessos, mostraram que os loci de marcadores ISSR não possibilitaram discriminar os acessos de pimenta segundo sua localização de coleta, mas demonstraram grande acurácia em distinguir os acessos segundo sua variabilidade genética. Gichuki et al., (2003) estudando a relação entre a procedência dos acessos de uma olerícola e a diversidade genética, constataram que apenas 6,6 % dos acessos estudados apresentavam correlação entre a distância geográfica e genética, sendo a maior parte da variação observada (93,4 %) dentre os genótipos advindos de uma mesma região geográfica ou localidade. Entretanto, Aguilera et al., (2011) analisando uma população de acessos de tomate conseguiram discriminar os materiais provenientes de diferentes lugares, permitindo a alocação dos acessos de uma mesma região em um mesmo grupo pelo método UPGMA.

4. CONCLUSÕES

1. A caracterização molecular foi eficiente para estimar a diversidade genética entre os acessos, evidenciando significativa divergência, sendo importante ferramenta para o conhecimento e uso dos acessos;
2. Marcadores do tipo ISSR possibilitaram acessar a variabilidade genética da população de pimenta em estudo, na qual todos os acessos foram considerados distintos, o que permitiu desconsiderar a hipótese de duplicatas;
3. Não foi observada correlação entre distância genética e distância geográfica, o que pode ser reflexo da prática comum de trocas de pimenta entre os produtores rurais;
4. Os agricultores tradicionais da região Sul do Estado do Espírito Santo detêm e auxiliam na conservação de genótipos de pimenta com expressiva diversidade genética, evitando a perda deste recurso genético.

5. AGRADECIMENTOS

Ao IFES (Instituto Federal do Espírito Santo), pela concessão da bolsa de iniciação científica ao primeiro autor, a UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro) e a FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) pelo suporte técnico.

6. REFERÊNCIAS

- AHMED, S.M. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers in the evaluation of genetic polymorphism of Egyptian *Capsicum* L. hybrids. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12, n. 7, p. 665-669, 2013.
- ALMEKINDERS, C.J.M. & ELINGS, A. Collaboration of farmers and breeders: participatory crop improvement in perspective. *Euphytica*. Vol. 122, p.425-438, 2001.
- AGUILERA, J. G.; PESSONI, L. A.; RODRIGUES, G. B.; ELSAYED, A. Y.; SILVA, D. J. H. da; BARROS, E. G. de. Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. Vol. 6, n. 2, p. 243-252, 2011.
- BORBA, R. DE S.; GARCIA A, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology*, Londrina. Vol. 34, p. 565-569, 2005.
- CABRAL, P.D.S; SOARES, T.C.B; GONÇALVES, L.S.A; AMARAL JÚNIOR, A.T; LIMA, A.B.P; RODRIGUES, R; MATTA, F.P.. Quantification of the diversity among common bean accessions using Ward-MLM strategy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Vol. 45, n.10, p. 1124-1132, 2010.
- CEZAR, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M.A.; COSTA, C. P. Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de *Capsicum* spp. *Summa Phytopathologica*. V. 35, n.1, p.39-43, 2009.
- COSTA, F.R.; PEREIRA, T.N.S.; SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R. Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. *Ciência Rural*. Vol. 39, p. 696-704, 2009.
- CRUZ, C.D. *Programa GENES: estatística experimental e matrizes*. Viçosa: UFV. 285p. 2006.
- DIAS, G.B.; GOMES, V.M.; MORAIS, T.M.S., ZOTTICH, U.P., RABELO, G.R., CARVALHO, A.O., MOULIN, M.M., GONCALVES, L.S.A., RODRIGUES, R., CUNHA, M. Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genetics and Molecular Research*. Vol. 23, p.222 - 232, 2013.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. Vol 12, p. 13-15, 1990.
- GICHUKI, S.T.; GICHUKI, M.; ZHANG, D.; HERMANN, M.; SCHMIDT, J.; GLOSSL, J.; BURG, K. Genetic diversity in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] in relationship to geographic sources as assessed with RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Vol. 50, p. 429-437, 2003.
- GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; BENTO, C.S.; MOULIN, M.M.; ARAÚJO, M.L.; DAHER, R.F.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G. Divergência genética em tomate estimada

por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. Horticultura Brasileira. Vol. 26. P. 364-370, 2008.

KUMAR, R.; DWIVEDI, N.; SINGH, R.K.; KUMAR, S. A review on molecular characterization of pepper for Capsaicin and Oleoresin. Intl. J. Plant Breed. Vol. 5, p. 99-110, 2011.

MOSCONE, E.A.; SCALDAFERRO, M.A.; GRABIELE, M.; CECCHINI, N.M.; GARCÍA, Y. S.; JARRET, R.; DAVIÑA, J. R.; DUCASSE, D.A.; BARBOZA, G.E.; EHRENDORFER, F. The Evolution of Chili Peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a Cytogenetic Perspective. VIth International Solanaceae Conference. Acta Hort, Vol. 45, p. 138-139, 2007.

MOULIN, M.M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A.; SUDRÉ, C.P.; GONZAGA, M.P. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). Acta Scientiarum. Agronomy (Impresso) . Vol. 34, p. 139-147, 2012.

PATEL, A.S.; SASIDHARAN, N.; ASHISH, G.V.; VINAY, k. Genetic relation in *Capsicum annuum* [L.] cultivars through microsatellite markers: SSR and ISSR. Electr. J. Plant Breed. Vol. 2, p. 67-76, 2011.

REFAAT, M.H.; HODA, A.S.; ELGARHY. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on ISSR-PCR markers in Pepper (*Capsicum annuum* L.). Ann. Agric. Sci. Vol. 45, p. 1565-1579, 2007.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. WH Freeman and Company. New York. USA, 3^o edição, 1995.

SPOONER, D.; VAN TREUREN, R.; DE VICENTE, M.C. Molecular markers for genebank management. IPGRI. Technical Bulletin n^o 10. Disponível em: www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/1082.pdf. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy, 2005.

SUDRÉ, C.P.; GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; RIVA-SOUZA, E. M.; BENTO, C dos S. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*. Vol. 9, p: 283-294, 2010.

THUL, S.T.; MAHENDRA P.; DAROKAR.; AJIT, K.; SHASANY, S.; P. S. KHANUJA. Molecular Profiling for Genetic Variability in *Capsicum* Species Based on ISSR and RAPD Markers. Mol Biotechnol. Vol. 8, p. 1422-1429, 2011.

VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L.; GÓES, M. Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais. In: Nass, L,L.; Valois, A.C.C.; Melo, I. S.; Valadares-Inglis, M.C. Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis, MT. Fundação MT. Cap 6, p. 123-149, 2001.