

Lívia do Vale Martins
Bacharel em Ciências Biológicas

Caracterização citogenética com ênfase na cromatina em acessos de pimentas
Capsicum L.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Peron

Coorientadoras:

Prof^a. Dr^a. Lidiane de Lima Feitoza

Prof^a. Dr^a. Ângela Celis de Almeida Lopes

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Piauí como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de “Mestre”.**

Teresina – PI

2015

**Caracterização citogenética com ênfase na cromatina em acessos de pimentas
Capsicum L.**

Lívia do Vale Martins

Aprovada em ____/____/____

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Pedro Marcos Almeida – UESPI

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Lidiane de Lima Feitoza – PPGM/UFPI

**Prof^a. Dr^a. Ana Paula Peron – CSHNB/UFPI
(Orientadora)**

Aos meus queridos pais, Lúcia e Aníbal, e aos meus irmãos e amigos, Ismar e Lígia, que me mostram diariamente o real significado da palavra família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, energia superior que nos rege, por colocar em meu caminho pessoas especiais e essenciais ao meu crescimento pessoal e profissional;

À FAPEPI (Fundação de Amparo à Pesquisa do Piauí) pela concessão da bolsa de estudos;

Aos meus pais, Aníbal e Lúcia, pelo suporte moral e ético. Em especial, à minha mãe, meu porto seguro, exemplo de altruísmo, simplicidade, alegria, inteligência e força. Obrigada por ter me apresentado o fascinante mundo da leitura e das línguas. Ao meu irmão Ismar e à minha irmã Lígia, exemplos de integridade, profissionalismo e caráter, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, risadas e abraços de alma;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Paula Peron, por não tornar a distância física um empecilho. Obrigada pela excelente orientação, pela ajuda, pelas dicas e críticas construtivas e por estar sempre presente durante esses anos;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lidiane de Lima Feitoza, minha referência em citogenética. Obrigada pela amizade, pelo incentivo à pesquisa e à vida acadêmica, e por todo ensinamento prático e teórico de citogenética. Obrigada por ser um exemplo de pessoa correta e determinada e profissional íntegra e exigente, sem perder a ternura, o bom humor e a leveza inerentes a você;

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Ângela Celis de Almeida Lopes e Regina Lucia Ferreira Gomes, nossas “mães da pós-graduação”, por sempre tratarem seus “filhos” da forma mais amável e calorosa possível, sempre nos incentivando a buscar o melhor pessoal e profissionalmente;

Ao Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho, pela contribuição direta e indireta ao trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, pelas sugestões e por disponibilizar abertamente, durante um mês, o Laboratório de Citogenética Vegetal da UFRPE, fato essencial para a finalização do trabalho;

Ao Prof. Dr. Pedro Marcos Almeida, pela atenção, cuidado e critério com as correções e pelas dicas que só acrescentaram ao trabalho;

Aos meus amigos da pós-graduação, por compartilhar momentos difíceis e felizes durante dois árduos anos. À Bruna, minha amiga desde a graduação, com quem sempre dividi os melhores sorrisos e as maiores preocupações. Obrigada por ser alegre, delicada e gentil em tempo integral. Ao meu querido Marcones, amor à

primeira vista, com quem compartilhei histórias e momentos maravilhosos. Obrigada pela ajuda, pela amizade e por ser luz que irradia a todos que estão a sua volta. À Artemisa, por ser uma das pessoas mais doces e dedicadas que conheci, responsável pela união e harmonia da sala. Ao Mário, pelo exemplo de honestidade, bondade e simplicidade. À Anielle, pelas conversas e risos diários;

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Citogenética da UFPI, Elisa, Bruninha, Bruna, Helenice, Bruno, Antônio Neto, Thalyta e Claudiana, por tornarem a rotina estressante e cansativa um momento de alegria, conversas e incentivo mútuo. Ao Lamonier Ramos (UFRPE), pela amizade sincera e ajuda constante na minha estada em Recife, tornando esses dias laboriosos mais leves;

Aos meus amigos de longa data, por sempre acreditarem em mim. Obrigada pelo apoio, incentivo, pelas conversas, pelos momentos inesquecíveis e pelas viagens incríveis, e por fazerem parte do que sou hoje;

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

“Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1	
INTRODUÇÃO.....	124
2	
REVISÃO	DE
LITERATURA.....	146
2.1 Descrição taxonômica, aspectos biológicos e espécies domesticadas do gênero <i>Capsicum</i>	146
2.2 Centro de origem, domesticação e diversidade de pimentas <i>Capsicum</i>	208
2.2.1 Evolução de pimentas <i>Capsicum</i>	20
2.3 Importância socioeconômica das pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	22
2.4 Bancos de Germoplasma, variabilidade genética e melhoramento genético em <i>Capsicum</i>	213
2.5 Técnicas citogenéticas e suas aplicações no gênero <i>Capsicum</i>	235
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Obtenção das Raízes, pré-tratamento e fixação das células.....	291
3.2 Coloração Convencional com <i>Giemsa</i>	291
3.3 Bandeamento C-Giemsa	291
3.4 Bandeamento com fluorocromos CMA e DAPI.....	302
3.5 Imunocoloração utilizando anticorpos anti-H4K5 e anti-H3S10f.....	32
3.6 Fotodocumentação e Morfometria	302
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	324
5 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

RESUMO

MARTINS, L. V **Caracterização citogenética com ênfase na cromatina em acessos de pimentas *Capsicum* L.** 55 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – UFPI, Teresina, 2015.

O trabalho teve como objetivo avaliar citogeneticamente diferentes acessos de pimentas domesticadas *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí (BAGC-UFPI). Esta avaliação foi realizada por meio das técnicas de coloração convencional com Giemsa, bandeamentos C e CMA/DAPI e, pela primeira vez no gênero, a técnica de imunocoloração utilizando os anticorpos anti-H4K5ac e anti-H3S10f. Todos os acessos apresentaram $2n=24$ cromossomos, núcleo interfásico semirreticulado e padrão de condensação profásico proximal. O padrão de marcação com CMA variou de quatro bandas terminais para a maioria dos acessos, ao máximo de 10, 12 e 18 bandas variáveis de $CMA^{++}/DAPI^{-}$ e $CMA^{+}/DAPI^0$ nos acessos BAGC 110, 104 e 194, respectivamente, identificados como *C. baccatum* var. *pendulum*. Esta espécie está em um agrupamento taxonômico diferente e mais derivado em relação às demais espécies domesticadas e exibe características particulares como aumento do tamanho do cariótipo e aumento da complexidade do padrão de heterocromatina. A marcação com anti-H4K5ac ocorreu na cromatina difusa dos núcleos e na eucromatina terminal dos cromossomos, sugerindo que estas regiões são potencialmente ativas e ricas em genes, enquanto a marcação com anti-H3S10f foi ausente nos núcleos interfásicos e visível apenas na região pericentromérica, e está relacionada a mecanismos de coesão entre cromátides e/ou condensação cromossômica. Os resultados obtidos são de grande importância aos programas de melhoramento genético de *Capsicum*, pois além de fornecer características citogenéticas adicionais ao BAGC-UFPI, é uma ferramenta útil na localização de acessos duplicados, na sua delimitação taxonômica bem como na conservação desses recursos genéticos.

Palavras-chave: *Capsicum*, coloração convencional, bandeamento C, fluorocromos CMA e DAPI, histonas.

ABSTRACT

MARTINS, L. V. **Cytogenetic characterization with emphasis on chromatin in peppers' accessions of *Capsicum* L.** 55 p. Dissertation (Master in Genetics and Breeding) – UFPI, Teresina, 2015.

The work aimed evaluate cytogenetically different domesticated peppers accessions *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* and *C. frutescens* from *Capsicum* Germplasm Active Bank at Universidade Federal do Piauí (BAGC-UFPI). This evaluation was performed through Giemsa staining, Giemsa C-banding, CMA/DAPI banding techniques and, for the first time in the genus, immunostaining technique using antibodies anti-H4K5ac and anti-H3-S10f. All accessions showed $2n=24$ chromosomes, semi-reticulate interphase nuclei and proximal prophase condensation pattern. The staining pattern with CMA ranged from four terminal bands in most of accessions to a maximum of 10, 12 and 18 variable bands of CMA⁺⁺/DAPI⁻ and CMA⁺/DAPI⁰ in BAGC 110, 104 and 194, respectively, identified as *C. baccatum* var. *pendulum*. This specie is in a different and more derivative taxonomic grouping comparing to other domesticated species and exhibits individual features like the increase of karyotype length and the increase of heterochromatin pattern complexity. Staining with anti-H4k5ac occurred on diffuse chromatin of nuclei and in terminal euchromatin of chromosomes indicates that these regions are potentially active and rich in genes, while staining with anti-H3S10ph was absent in interphase nuclei and visible only in pericentromeric region and is related to chromatid cohesion and/or chromosome condensation mechanisms. These results are important to *Capsicum*'s genetic breeding programs because provide additional cytogenetic features to BAGC-UFPI, also is a useful tool in localization of duplicate accessions, their taxonomic delimitation and conversation of these genetic resources.

Keywords: *Capsicum*, Giemsa staining, C-banding, CMA and DAPI fluorochromes, histones.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Polimorfismo de frutos das diferentes espécies domesticadas do gênero *Capsicum*.
 Fonte: Embrapa Hortaliças..... 17
- Figura 2 -** Esquema geográfico dos centros de origem e diversidade de *Capsicum*. Os quatro centros de origem de pimentas indicados são: cinza - (1), preto - (2), linhas verticais - (3), região hachurada - 4. Abreviações dos nomes das espécies: *ann* - *C. annuum*, *bac* - *C. baccatum*, *cam* - *C. campylopodium*, *car* - *C. cardenasii*, *cha* - *C. chacoense*, *chi* - *C. chinense*, *cor* - *C. cornutum*, *exi* - *C. eximium*, *fle* - *C. flexuosum*, *fri* - *C. friburguense*, *fru* - *C. frutescens*, *gal* - *C. galapagoense*, *lan* - *C. lanceolatum*, *mir* - *C. mirabile*, *par* - *C. parvifolium*, *per* - *C. pereirae*, *pra* - *C. praetermissum*, *pub* - *C. pubescens*, *rec* - *C. recurvatum*, *rho* - *C. rhomboideum*, *sch* - *C. schottianum*, *tov* - *C. tovarii*, *vil* - *C. villosum*.
 Fonte: Moscone et al. (2007)..... 19
- Figura 3 -** Diagrama das possíveis relações evolutivas entre espécies de *Capsicum* baseado nas características cariotípicas. As espécies domesticadas *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* pertencem a um mesmo grupo ancestral, enquanto *C. baccatum* pertence a um grupo distinto e mais derivado, compartilhado com *C. praetermissum*.
 Fonte: Moscone et al. (2007)..... 21
- Figura 4 -** Análise cariotípica em acessos de *Capsicum* sp. através da técnica de coloração convencional. a- núcleo interfásico; a'- metáfase com setas indicando par cromossômico heteropicnótico; b, c, f, g - prometáfase; c', d, e, h, i - metáfase; e- cariótipo com dois cromossomos perdidos. Setas maiores em e' e g indicam RONS. Barra representa 10 µm 34
- Figura 5 -** Análise de cinco acessos de *Capsicum* sp. através da técnica de bandeamento C-Giemsa. a - e - núcleos interfásicos; c'- prometáfase; a',b',d',e'- metáfase. Setas maiores indicam grandes blocos heterocromáticos e setas menores indicam pequenos blocos heterocromáticos. Barra representa 10 µm..... 39
- Figura 6 -** Dupla coloração CMA/DAPI em acessos de *Capsicum* sp. a' - i' - sobreposição de metáfases mitóticas; e e i - sobreposição de CMA/DAPI dos núcleos interfásicos. Setas indicam grandes blocos CMA⁺⁺. Cabeças de seta indicam pequenos blocos CMA⁺ de difícil visualização, sendo ampliados em todos os insertos. Em azul (DAPI), e em amarelo (CMA). Barra representa 10µm..... 42

- Figura 7 -** Idiograma representando o tamanho, morfologia e distribuição de bandas terminais CMA⁺⁺ (bandas amarelas maiores) e bandas CMA⁺ (bandas amarelas menores) em cada cromossomo dos acessos de *Capsicum* pertencentes ao BAGC – UFPI..... 43
- Figura 8 -** Padrão de marcação com o anticorpo anti-H4K5ac em acessos de *Capsicum* sp. a - a'' – núcleo interfásico; b - b''- prófase; b''' – b'''' – prometáfase; a''''', c'', d''- sobreposição de metáfase mitótica, mostrando a cromatina terminal fortemente marcada (verde) em relação à cromatina condensada (vermelho). Insetos superiores indicam cromossomo com região fortemente acetilada em um único braço terminal, enquanto insetos inferiores indicam cromossomo regiões terminais fortemente acetiladas em ambos os braços. DAPI pseudocorado em vermelho e anti-H4K5ac (verde). Barra representa 10 µm..... 46
- Figura 9 -** Marcação com o anticorpo anti-H3S10f em acessos de *Capsicum* pertencentes ao BAGC – UFPI. Observa-se intensa marcação do anticorpo (em verde) na região pericentromérica (inserto em b). Núcleos interfásicos no canto esquerdo de a e b não foram marcados. DAPI pseudocorado em vermelho e anti-H3S10f em verde. Barra representa 10 µm..... 48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Identificação de 13 acessos de pimentas do gênero *Capsicum* provenientes do Banco ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Universidade Federal do Piauí (BAGC – UFPI)..... 30
- Tabela 2** - Número cromossômico diploide, intervalo do tamanho cromossômico (ITC), média da razão entre os braços do cromossomo (r), fórmula cariotípica (FC), comprimento total cromossômico (CTC), comprimento médio cromossômico (CMC), comprimento total do lote haploide (CTLH) e número de bandas CMA/DAPI (CMA₃/DAPI). ++ representa bandas CMA mais fortemente coradas e bandas +, bandas CMA mais fracamente coradas. ⁰ representa banda AT neutra e -, banda AT reduzida..... 36

LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS

AT	Adenina e timina
BAGC Federal do Piauí	Banco Ativo de Germoplasma da Universidade
CMA	Cromomicina A ₃
DA	Distamicina
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization
GC	Guanina e citosina
HC	Heterocromatina constitutiva

1 INTRODUÇÃO

As espécies domesticadas *Capsicum annum* (pimentão, pimenta-doce), *C. baccatum* (dedo-de-moça, chapéu-de-frade), *C. chinense* (pimenta-de-cheiro, pimenta-de-bode, murici) e *C. frutescens* (pimenta malagueta) são amplamente comercializadas no mercado de hortaliças frescas do Brasil, gerando alta rentabilidade para este segmento econômico (VILLELA et al., 2014). Estas pimentas são utilizadas na culinária, na forma *in natura* e processadas, na medicina popular e como plantas ornamentais. As pimentas também empregam elevada mão de obra no setor agrícola e comercial deste país (HAVERROTH; NEGREIROS, 2011).

As pimentas do gênero *Capsicum* L. são cultivadas em todo território brasileiro, com área total de 15.000 ha e safra de 300.000 toneladas de frutos por ano (MELO et al., 2014), com produção em escala industrial nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Ceará e Bahia (SOUSA et al., 2015). No entanto, outros estados brasileiros como o Piauí, Maranhão e Paraíba possuem produção de pimentas economicamente caracterizada como incipiente, apesar de disporem de elementos ambientais favoráveis ao cultivo destas solanáceas, como temperatura e precipitação pluviométrica adequada. Os dados da produção agrícola nesses estados são imprecisos e irregulares, e o seu cultivo é realizado, principalmente, em nível de agricultura familiar (SOUSA, 2012; MELO et al., 2014).

As plantas do gênero *Capsicum* apresentam ampla variabilidade genética entre suas espécies e entre representantes de uma mesma espécie em relação às colorações, tamanhos, morfologias e níveis de pungência de seus frutos (SOUSA et al., 2015). Esta variabilidade, considerada por muitos pesquisadores ainda como pouco explorada do ponto de vista econômico (KIM et al., 2011; SILVA NETO et al., 2014), aliada à sua excelente adaptação e ampla distribuição em território brasileiro, faz do Brasil um importante centro de diversidade de pimentas, condições que favorecem a implantação e o desenvolvimento de programas de melhoramento genético de *Capsicum* no país (VILLELA et al., 2014).

Todo projeto de melhoramento é dependente da variabilidade genética disponível nos acessos presentes em bancos de germoplasma (SIGNORINI et al., 2013). Estes materiais conservados necessitam ser bem conhecidos para que sejam utilizados de forma adequada e efetiva pelos melhoristas (NEITZKE et al., 2010).

Seu conhecimento pode ser realizado de muitas formas, como, por exemplo, por meio da caracterização citogenética, bioquímica e molecular, além da descrição morfomagnômica. Com relação à citogenética, Sousa (2012) e Melo et al. (2014), relatam a importância dessa técnica, que fornece informações para a elucidação de fatos relacionados à taxonomia das plantas, para delimitação taxonômica precisa entre espécies cultivadas, semicultivadas e silvestres (KIM et al., 2011) e para a ampliação das perspectivas de conservação da diversidade vegetal (SOUZA et al., 2011).

Os números cromossômicos básicos observados em *Capsicum* são $x = 12$ e $x = 13$. As espécies domesticadas apresentam $2n=2x=24$, com cariótipos simétricos e cromossomos pequenos, baixo conteúdo de DNA e baixa quantidade de heterocromatina. Já as espécies semidomesticadas e diversas silvestres, além de $2n=24$ cromossomos, também apresentam $2n=2x=26$, com cariótipos assimétricos e de maior tamanho, alto conteúdo de DNA e maior complexidade quanto aos padrões de heterocromatina em relação às espécies domesticadas (MOSCONE et al., 2007). No entanto, segundo Teodoro-Pardo (2007), já foram observados polimorfismos cromossômicos entre indivíduos de uma mesma espécie de pimenta e entre espécies próximas, caracterizando a presença de citótipos distintos.

Considerando a necessidade de melhor compreender a estrutura genômica das pimentas, bem como de disponibilizar mais informações quanto aos recursos genéticos presentes no Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Universidade Federal do Piauí (BAGC-UFPI), o presente trabalho caracterizou citogeneticamente acessos de pimentas *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* provenientes do BAGC-UFPI, por meio das técnicas de coloração com Giemsa, bandeamentos C e CMA/DAPI e, pela primeira vez em plantas deste gênero, a técnica de imunocoloração utilizando os anticorpos anti-H4K5ac e anti-H3S10f.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descrição taxonômica, aspectos biológicos e espécies domesticadas do gênero *Capsicum*

De acordo com o sistema APG II (2003), as plantas do gênero *Capsicum* estão incluídas no Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Solanales, Família Solanaceae, Subfamília Solanoideae, Tribo Solaneae, Subtribo Capsicinae, e Gênero *Capsicum*. Representando-as, encontra-se um grupo de plantas não-pungentes, os pimentões, e um grupo de plantas pungentes, as pimentas (HUNZIKER, 2001).

A altura e a forma de crescimento das pimentas *Capsicum* são, principalmente, arbustivas perenes. No entanto, algumas espécies, como a *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, apresentam crescimento herbáceo, e pimentas selvagens como *C. eximium*, desenvolvem-se em árvores, apresentando formas tanto arbustivas como em tronco (MOSCONE et al., 2007). Estas hortaliças possuem sistema radicular pivotante, caule lenhoso ou semi-lenhoso, ramificado, ereto ou recurvado. Quanto à altura, algumas cultivares podem atingir até 1,5 metros e outras, a grande maioria, são anãs. Apresentam folhas lanceoladas com diferentes tonalidades de verde e nervuras bem marcadas (PICKERSGRILL, 2007).

Já as flores destas solanáceas podem ser brancas, azuis, verdes, amarelas ou púrpuras com as corolas apresentando combinações de cores em seus tubos e lóbulos (BARBOSA; BIANCHETTI, 2005; MOSCONE et al., 2007). Seus frutos são do tipo baga, de estrutura oca e capsular e, em táxons cultivados, podem apresentar morfologias diferentes devido à seleção humana (PICKERSGRILL, 2007). As diferentes espécies e variedades de *Capsicum* podem ser identificadas pelo número de flores por nó, pela constrição do cálice, pela posição da flor e do pedicelo, e pela presença ou ausência de manchas nos lobos das pétalas e margem do cálice (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008). Estas pimentas, em geral, apresentam flores hermafroditas e sistema reprodutivo autógamo (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008), ocorrendo variações nos níveis de polinização cruzada dentro e entre as espécies (RIBEIRO; REIFSCHNEIDER, 2008; VILLELA et al., 2014).

Atualmente, não há um consenso entre os taxonomistas quanto ao número de espécies de *Capsicum* descritas, se 29 ou 31 (SOUSA et al., 2015). Porém, entre

elas, cinco são classificadas como domesticadas, que são: *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. e *C. pubescens* Ruiz & Pav. (SOUZA et al., 2011), sendo as quatro primeiras de excelente adaptação às condições de clima tropical, com ampla variabilidade genética entre si e extensivamente cultivadas em território brasileiro (VILELLA et al., 2014).

A espécie *C. annuum* é a mais cultivada não somente no Brasil, mas no mundo todo. É representada pelos pimentões (Figura 1a) e pimentas de consumo fresco ou *in natura* (SOUSA, 2012). Já as pimentas *C. baccatum*, conhecidas popularmente por dedo-de-moça, chapéu-de-frade, chifre-de-veado e calabresa, são caracterizadas pela forte pungência de seus frutos (Figura 1b) (MELO et al., 2014). Os frutos destas duas espécies são geralmente pendentes, persistentes e de polpa firme, com variedade de cores e formas.

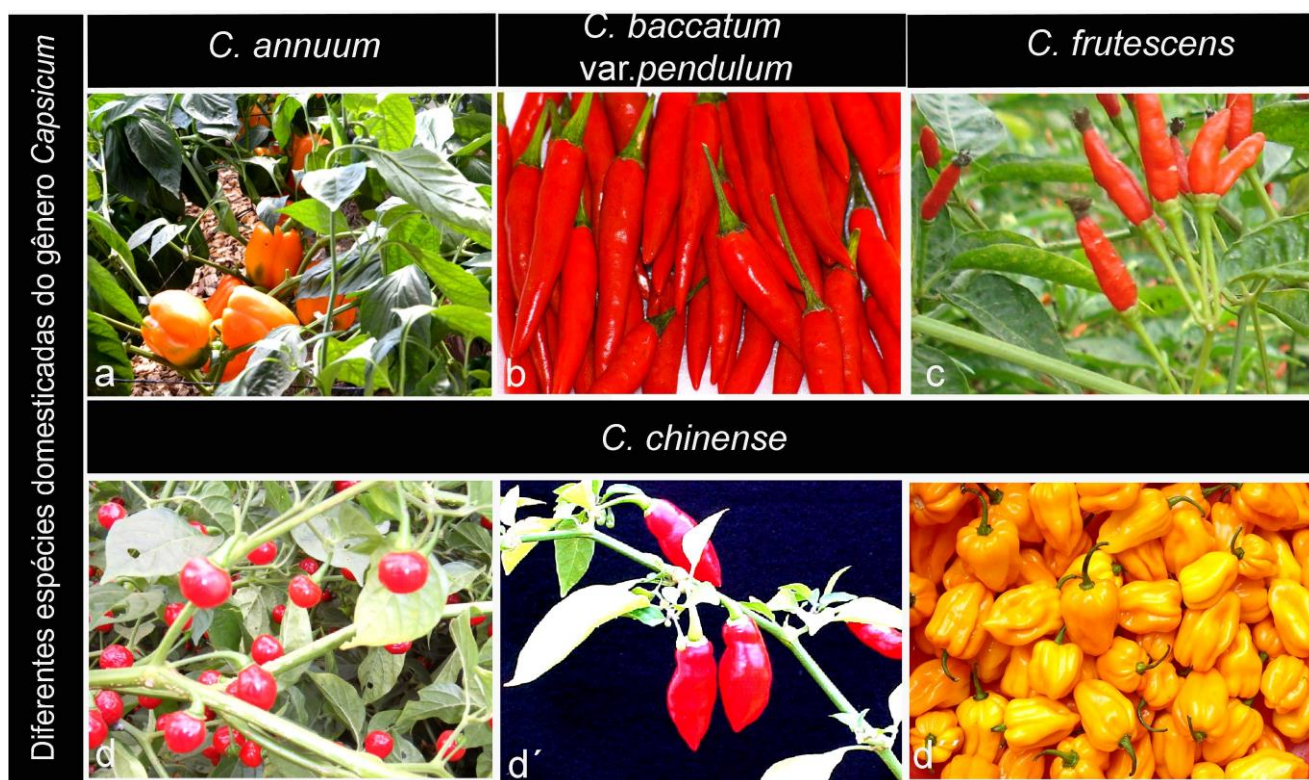


Figura 1 - Polimorfismo de frutos das diferentes espécies domesticadas do gênero *Capsicum*. Fonte: Embrapa Hortaliças.

A espécie *C. frutescens*, considerada a pimenta picante mais consumida no país, a malagueta (Figura 1c), é muito apreciada por condimentar alimentos e por

excitar o apetite, sendo consumida tanto *in natura* como em conserva. Seus frutos possuem diferentes tonalidades de vermelho, são cônicos, eretos, com parede delgada e de polpa mole. Por fim, a espécie *C. chinense*, considerada a mais brasileira das espécies domesticadas (CARVALHO; BIANCHETTI, 2008), é caracterizada por possuir frutos aromáticos e extremamente picantes, com expressiva variabilidade de formatos e cores. É representada pelas pimentas de bode (Figura 1 d), de cheiro (Figura 1 d' e d''), *scorpion* e *bhut jolokia*, sendo as duas últimas consideradas as mais picantes do mundo e, portanto, de maior valor comercial (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

2.2 Centro de origem, domesticação e diversidade de pimentas *Capsicum*

As pimentas *Capsicum* estão entre as plantas cultivadas mais antigas do mundo, datando de 7000 anos a.C. O seu principal centro de origem são as Américas, com espécies nativas na América tropical e temperada. Sua dispersão em nível mundial foi impulsionada pelo mercantilismo europeu no século XVI, dispersa por navegadores portugueses e espanhóis, que introduziram a cultura na África e Europa, sendo rapidamente aceitas e difundidas na época quando comparada a outras solanáceas de grande importância na alimentação humana, como o tomate e a batata (REIFSCHNEIDER et al., 2014).

De acordo com Hunziker (2001), as espécies de *Capsicum* estão distribuídas em quatro centros de origem, que são: (1) da faixa sul dos Estados Unidos passando pelo México e se estendendo até o oeste da América do Sul (Peru); (2) parte do nordeste do Brasil e a costa da Venezuela; (3) da região central da Bolívia passando pelo Paraguai até o norte e a região central da Argentina; e, por fim, (4) a costa leste do Brasil (Figura 2) (MOSCONE et al., 2007).

Dentre as 23 espécies destacadas na Figura 2, a maioria é endêmica da América do Sul, sendo 15 amplamente distribuídas no Brasil (BARBOZA; BIANCHETTI, 2005). *Capsicum annum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* são as espécies domesticadas ocorrentes em território brasileiro, e as espécies silvestres identificadas são *C. campylopodium*, *C. cornutum*, *C. mirabile*, *C. parvifolium*, *C. praetermissum*, *C. recurvatum*, *C. schottianum* e *C. vilosum*, além das três espécies recentemente descritas na região sudeste, que são: *C. pereirae*, *C. friburguense*, *C. hunzikerianum* (não destacada no mapa) (REIFSCHNEIDER et al., 2014).



Figura 2 - Esquema geográfico dos centros de origem e diversidade de *Capsicum*. Os quatro centros de origem de pimentas indicados são: cinza - (1), preto - (2), linhas verticais - (3), região hachurada - 4. Abreviações dos nomes das espécies: *ann* - *C. annuum*, *bac* - *C. baccatum*, *cam* - *C. campylopodium*, *car* - *C. cardenasii*, *cha* - *C. chacoense*, *chi* - *C. chinense*, *cor* - *C. cornutum*, *exi* - *C. eximium*, *fle* - *C. flexuosum*, *fri* - *C. friburguense*, *fru* - *C. frutescens*, *gal* - *C. galapagoense*, *lan* - *C. lanceolatum*, *mir* - *C. mirabile*, *par* - *C. parvifolium*, *per* - *C. pereirae*, *pra* - *C. praetermissum*, *pub* - *C. pubescens*, *rec* - *C. recurvatum*, *rho* - *C. rhomboideum*, *sch* - *C. schottianum*, *tov* - *C. tovarii*, *vil* - *C. villosum*. Fonte: Moscone et al. (2007).

Quanto ao processo de domesticação das pimentas *Capsicum*, sua ocorrência deu-se da seguinte forma: *C. annuum*, no México; *C. baccatum*, na América do Sul; *C. chinense*, em toda América tropical, sendo encontrada mais comumente na Amazônia; e *C. frutescens*, nos Estados Unidos. Segundo Crosby (2008), as espécies deste gênero foram selecionadas em seus centros primários de origem e, posteriormente, levadas para outras regiões, os centros secundários. A América do Sul é, portanto, um importante centro de diversidade genética destas

pimentas, sendo o Brasil um centro secundário de diversidade de espécies domesticadas e silvestres (Figura 2).

Os centros secundários de diversidade de *C. annuum* existem no Sudeste e no centro da Europa, África, Ásia e partes da América Latina. Na Bolívia e no sudeste brasileiro, devido ao processo de seleção, ocorreu o surgimento de novos tipos morfológicos de *C. baccatum*, como a *C. baccatum* var. *pendulum*, amplamente difundida nas regiões tropicais da América do Sul, principalmente da costa do Peru ao Brasil; a *C. baccatum* var. *baccatum*, com distribuição semelhante à *pendulum*; e a *C. baccatum* var. *praetermissum*, presente exclusivamente no Brasil (REIFSCHNEIDER et al., 2014). Estas três variedades apresentam alta taxa de cruzamento entre si e com outras espécies do gênero, apresentando mais de 55% de viabilidade polínica nos híbridos (MOSCONE et al., 2007).

A bacia Amazônica é a maior área de diversidade de *C. chinense*, que se destaca por sua ampla adaptação às condições de clima equatorial e tropical e por possuir grande variabilidade genética (LANNES et al., 2007). A espécie *C. frutescens*, por sua vez, foi bastante difundida no sul da América Central e na América do Sul, sendo extensamente cultivada no Brasil (REIFSCHNEIDER et al., 2014).

2.2.1 Evolução de pimentas *Capsicum*

Quanto ao processo evolutivo das espécies domesticadas de *Capsicum*, Moscone et al. (2007) propuseram um modelo filogenético da sua possível evolução cromossômica baseado exclusivamente nas características cariotípicas das espécies silvestres, semidomesticadas e domesticadas analisadas (Figura 3). O gênero é considerado monofilético, com ancestral comum pertencente à família Solanaceae. O diagrama indica a divisão das espécies domesticadas em três grandes complexos: *annuum baccatum* e *chinense*.

O primeiro complexo, formado pelas espécies domesticadas *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, foi diferenciado relativamente cedo, logo após *C. chacoense*, a espécie mais primitiva do gênero. Os representantes desse complexo apresentam características cariotípicas comuns, como menor tamanho cariotípico, baixo conteúdo de DNA, padrão de bandeamento heterocromático simples, composto principalmente por bandas terminais e menor quantidade de heterocromatina rica em GC.

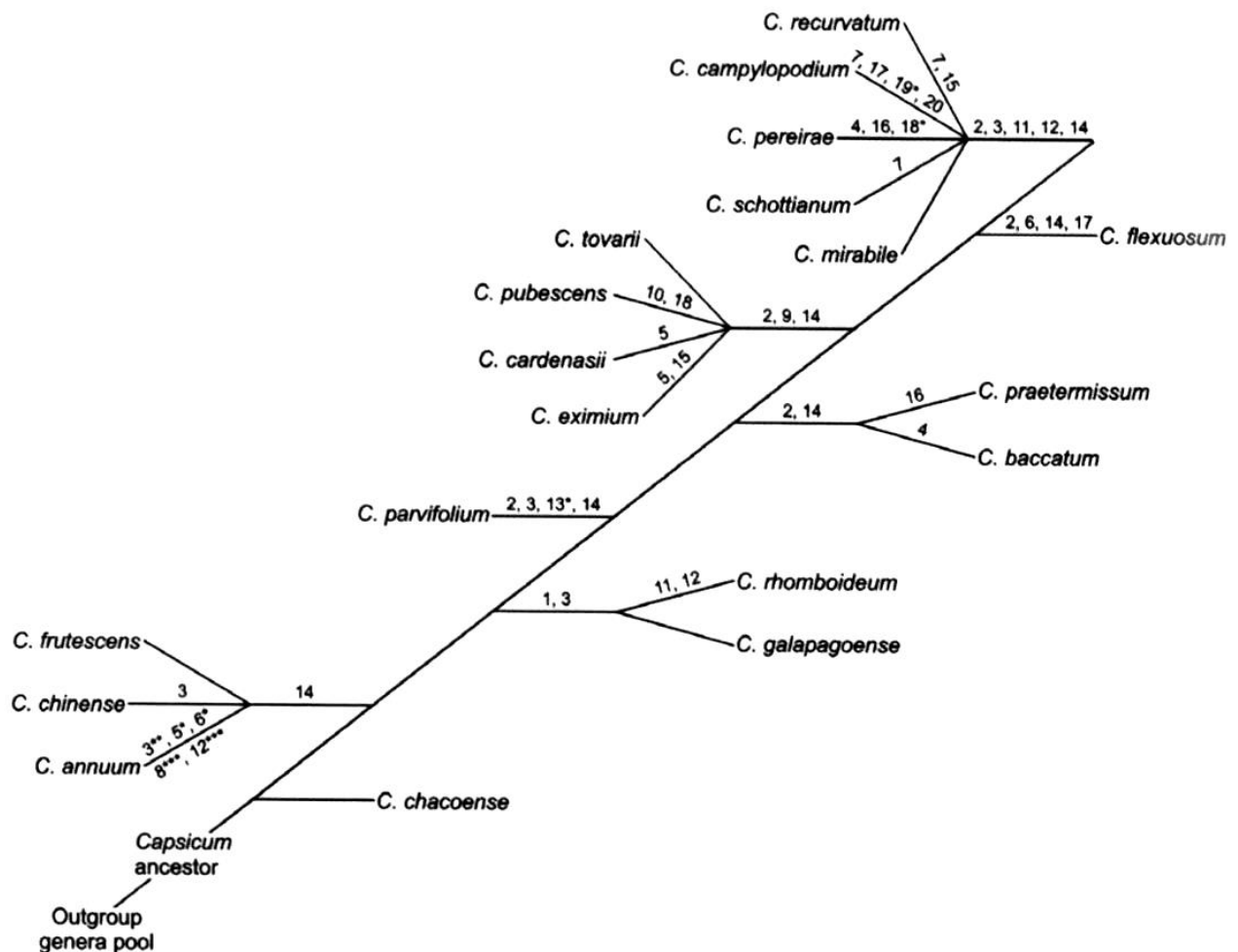


Figura 3 - Diagrama das possíveis relações evolutivas entre espécies de *Capsicum* baseado nas características cariotípicas. As espécies domesticadas *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* pertencem a um mesmo grupo ancestral, enquanto *C. baccatum* pertence a um grupo distinto e mais derivado, compartilhado com *C. praetermissum*. Fonte: Moscone et al. (2007).

Já entre as linhagens de pimentas mais avançadas e recentes, encontra-se o complexo formado pela espécie domesticada *C. baccatum* e pela espécie selvagem *C. praetermissum*, que compartilham características como o aumento do tamanho do cariotípico, alto conteúdo de DNA, maior complexidade no padrão de bandeamento cromossômico e maior quantidade de heterocromatina rica em GC, quando comparada ao complexo anterior. Por fim, o último complexo, denominado *pubescens*, é representado pela espécie domesticada não cultivada no Brasil *C. pubescens*, além das três espécies silvestres *C. tovarii*, *C. cardenasii* e *C. eximium*,

todas destacando-se em relação aos dois complexos anteriormente citados por apresentarem maior tamanho cariotípico e maior complexidade e quantidade de heterocromatina rica tanto em GC como em AT (MOSCONE et al., 2007).

O conhecimento acerca a origem, domesticação e diversidade, bem como as relações evolutivas das espécies domesticadas de *Capsicum* são etapas indispensáveis para que haja um contínuo desenvolvimento de cultivares economicamente mais produtivas, mais resistentes a fatores bióticos e abióticos e com maior valor nutricional (IBIZA et al., 2010). Sua importância econômica, com ênfase nas espécies domesticadas descritas, tem se acentuado a cada dia, despertando o interesse de novos produtores e consumidores em todo o mundo (ZENI; BOSIO, 2011).

2.3 Importância socioeconômica das pimentas do gênero *Capsicum*

As pimentas domesticadas *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* são cultivadas em diferentes partes do mundo, sendo a China e a Índia seus principais exportadores. Estes países juntos possuem, atualmente, mais de 1,4 milhão de hectares reservados para o cultivo destas plantas. Seus principais importadores são os Estados Unidos, a Europa e o Japão (REIFSCHNEIDER et al., 2014). O Brasil, por sua vez, conta com uma área de 15 mil hectares para o cultivo destas solanáceas, com média anual estimada em 300 mil toneladas de frutos (VILELLA et al., 2014). São cultivadas em todo território brasileiro, com safra superior nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Ceará e Bahia, que produzem, em média, de 10 a 30 toneladas por hectare (ESTEVES et al., 2011).

No entanto, outros estados brasileiros, como o Piauí, Maranhão e Paraíba, possuem produção de pimentas considerada de subsistência, apesar de possuírem elementos ambientais favoráveis à sua produção em larga escala, como temperatura média anual de 28° C e precipitação pluviométrica anual de 1300 mm distribuída de forma heterogênea. Os dados sobre a produção agrícola dos referidos estados são imprecisos e irregulares, em função de serem cultivadas por pequenos produtores em agricultura familiar, envolvendo somente pequenas produções caseiras e artesanais de molhos, conservas e geleias (SOUSA, 2012; MELO et al., 2014).

O cultivo de pimentas, considerado há pouco tempo uma atividade secundária, tem sofrido grandes transformações e assumido maior importância no país, visando atender as demandas internas e externas do mercado consumidor.

Essa progressão tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando-se um dos agronegócios mais importantes do país (HAVERROTH; NEGREIROS, 2011).

Atualmente, estas hortícolas destacam-se como importante produto do agronegócio brasileiro, beneficiando a balança comercial com superávit e aumentando as exportações a cada ano, contribuindo assim para o seu fortalecimento comercial e para a sua sustentabilidade. A sua produção tem importância destacada como atividade econômica, porque fixa o emprego do homem no campo, não necessitando de grandes extensões de terras para que tenha viabilidade econômica, e nem exige altos níveis de conhecimento técnico e de investimento (ASSUNÇÃO, 2013).

Assim, para o maior crescimento do agronegócio de *Capsicum*, é preciso que a produção agrícola aumente mediante o desenvolvimento de cultivares de diferentes tipos de pimentas, com resistência múltipla a doenças e com características agronômicas e industriais de interesse, as quais podem ser obtidas através da seleção de acessos disponíveis em bancos de germoplasma e através dos programas de melhoramento genético voltados para este gênero (ASSUNÇÃO, 2013). Estas são estratégias fundamentais desses programas, pois visam estabelecer prioridades de conservação, multiplicação, seleção e cruzamento das coleções dos seus germoplasmas (IBIZA et al., 2010).

2.4 Bancos de Germoplasma, variabilidade genética e melhoramento genético em *Capsicum*

A caracterização de germoplasmas de *Capsicum* é uma ferramenta útil para a conservação dos seus recursos genéticos e para o melhoramento de espécies do gênero (QUEIROZ; LOPES, 2007). Informações básicas acerca da diversidade genética destes genótipos são essenciais na localização de acessos duplicados e na identificação dos seus meios de reprodução, bem como da variabilidade entre os acessos analisados (MOSCONI et al., 2011).

Estes materiais são fonte de importância econômica quanto ao sabor, cor, produtividade e resistência a doenças provocadas por fungos, bactérias e vírus, como por exemplo, o mosaico amarelo do pimentão, causado pelo *Pepper yellow mosaic* vírus, que provoca perdas significativas na safra destas hortaliças (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2004). Há, portanto, uma grande necessidade de gerar novas

cultivares de pimentas que associem resistência às principais pragas e doenças, com melhores condições organolépticas e maior produtividade, principalmente para atender ao setor agroindustrial (BENTO et al., 2007). Além disso, é necessário o desenvolvimento de cultivares tolerantes às adversidades das condições bióticas e abióticas e, com maior qualidade nutricional na produção de vitaminas, β -caroteno e capsaicina (NOWACZYK et al., 2006).

No entanto, os bancos de pimentas existentes no Brasil necessitam de uma melhor descrição quanto ao número, morfologia e caracterização genética, a fim de gerar dados para os programas de melhoramento genético. No Brasil, existem atualmente poucos bancos ativos de germoplasmas de *Capsicum*, constituídos majoritariamente por espécies domesticadas, sendo encontrados um pequeno número de exemplares de espécies silvestres. Estas últimas, por sua vez, são de extrema importância por serem fontes potenciais de genes de resistência, que poderão ser utilizados nestes projetos de melhoramento (BIANCHETTI; CAVALHO, 2005; REIFSCHNEIDER et al., 2014).

A Embrapa Hortaliças desenvolve o programa de melhoramento genético de *Capsicum*, envolvendo diferentes centros de pesquisa em várias regiões brasileiras. Na Embrapa Clima Temperado, por sua vez, realiza-se a coleta, caracterização e conservação de germoplasmas de *Capsicum*, além de desenvolver populações, linhagens e cultivares resistentes a doenças e com características agrônomicas e industriais superiores às existentes no mercado, e mantém, desde 2002, um banco ativo de germoplasmas com mais de 4 mil acessos de espécies domesticadas e silvestres de *Capsicum* (BÜTTOW et al., 2010). Além disso, outros bancos de amostras deste gênero são mantidos no país em diferentes instituições, como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF) (REIFSCHNEIDER et al., 2014).

A Universidade Federal do Piauí possui, atualmente, acessos de pimentas organizadas em um Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum*, o BAGC-UFPI, com cerca de 195 acessos, representada por espécies domesticadas provenientes de diferentes estados brasileiros. Alguns trabalhos já foram desenvolvidos com o material proveniente deste banco, como por exemplo, o de caracterização botânica e divergência genética entre acessos de espécies domesticadas de pimentas por meio de descritores morfoagronômicos, realizado por Monteiro et al. (2008). Neste trabalho, os autores observaram divergência entre todos os acessos quanto às duas

chaves morfológicas de identificação e à análise discriminante de Anderson e o método de Tocher, com variação dos frutos em relação à cor, formato e tamanho. Também foram realizados trabalhos envolvendo o nível de resistência genética de dez acessos de *Capsicum* a sete isolados do fitopatógeno *Pythium* sp. (TRAJANO et al., 2009) e os resultados indicaram que o acesso de *C. annuum* var. *glabrisuculum* foi o mais resistente aos isolados dos fungos estudados, enquanto os acessos de *C. chinense* e *C. frutescens* foram os mais suscetíveis a estes microorganismos.

Mais recentemente, outras ferramentas, como as técnicas de citogenética, foram incorporadas para uma melhor caracterização dos acessos de *Capsicum* pertencentes ao BAGC-UFPI (SOUSA, 2012). A caracterização citogenética de diferentes acessos de bancos de germoplasmas representa, por sua vez, uma fonte importante de informações para melhoristas e conservacionistas, permitindo um melhor gerenciamento tanto do “pool gênico” como na escolha de recursos genéticos mais eficientes para os programas de melhoramento genético (BENKO-ISEPPON, 2001). Além do mais, os dados obtidos por meio das técnicas em citogenética fornecem informações relevantes na comparação entre espécies ou na exploração da variação entre indivíduos de uma mesma espécie (MOSCONE et al., 1996; SCALDAFERRO et al, 2012).

2.5 Técnicas citogenéticas e suas aplicações no gênero *Capsicum*

A citogenética tornou-se uma ferramenta valiosa na caracterização da diversidade dos recursos genéticos vegetais. A análise de cariótipos envolvendo o número, morfologia, tamanho dos cromossomos, relação entre braços cromossômicos, presença de constrição secundária e quantidade de heterocromatina, são informações importantes para comparar espécies ou detectar polimorfismos entre indivíduos da mesma espécie (MOSCONE et al., 1996). Esses dados associados a outras características citológicas, têm se mostrado importantes no reconhecimento de citótipos, variedades e híbridos (MIRZAIIE-NODOUSHAN et al., 2006), e na compreensão das relações filogenéticas dentro e entre táxons (GUERRA, 2000).

A visualização dos cromossomos mitóticos para estudo do cariótipo e a análise do ciclo celular é geralmente feita pela coloração convencional com corante Giemsa. Através dessa técnica, é possível identificar o tipo de núcleo interfásico, o padrão de condensação profásico, bem como o tamanho, número e morfologia dos

cromossomos analisados. Além disso, com o auxílio de *softwares* de parâmetros morfométricos, é possível determinar, mais facilmente, diferenças na fórmula cariotípica, comprimento do lote haplóide, comprimento dos braços cromossômicos e comprimento total de cromossomos e assim determinar, por exemplo, diferenças entre espécies de um mesmo gênero e entre representantes de uma mesma espécie (MIRZAI-E-NODOUSHAN et al., 2006).

Estudos citogenéticos com representantes do gênero *Capsicum* iniciaram-se por volta de 1940. Moscone (1990), por meio da técnica de coloração convencional com Giemsa, analisou o cariótipo de duas populações argentinas da espécie *C. chacoense* e identificou número diploide $2n=24$, distribuído em 11 pares metacêntricos e 1 par heteromórfico satelitado. Nilza (2001) realizou contagens de cromossomos mitóticos de quatro acessos de *C. chinense*, através de técnicas de coloração com Giemsa. Ocorreu variação no tamanho dos cromossomos, de 2,15 a 4,53 μm , com cariótipos apresentando 11 pares metacêntricos com variação no último par de autossomos, podendo-se encontrar cromossomos submetacêntricos ou subtelo-cêntricos. Souza et al. (2008), com o objetivo de caracterizar e analisar o cariótipo de quatro genótipos de *C. chinense* oriundos do Brasil, confirmaram o polimorfismo cromossômico de um acesso, que apresentou fórmula cariotípica $11M + 1SM$, diferindo dos demais, que apresentaram $11M + 1A$.

No Piauí, o primeiro trabalho citogenético utilizando acessos do BAGC da UFPI foi realizado por Sousa (2012). Nesse trabalho, foram analisados 12 acessos - BAGC 01, 07, 21, 26, 27, 34, 36, 37, 39, 49, 54, 59 - referentes às espécies *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, através da técnica de coloração com Giemsa, e os resultados indicaram que todos os acessos apresentaram $2n=2x=24$ cromossomos, com polimorfismo no acesso BAGC 37, além de constrição secundária presente em dois pares dos acessos BAGC 01 e BAGC 37. Entretanto, estudos mais avançados em citogenética são necessários para uma melhor compreensão acerca da diversidade e variação genética presente entre os acessos do BAGC-UFPI.

Outra metodologia empregada para a análise diferencial entre cromossomos é o bandeamento C-Giemsa. Com essa técnica, é possível localizar precisamente as regiões cromossômicas formadas por bandas de heterocromatina constitutiva que ficam mais fortemente coradas em relação ao restante do cromossomo (GUERRA b,

1988). Com este bandeamento, é possível realizar a caracterização cariotípica das espécies, variedades e citótipos de interesse, relatar o padrão de bandeamento C em cariótipos clássicos e explorar as tendências evolutivas, visando aumentar o conhecimento das pesquisas genéticas entre os táxons cultivados e silvestres (MOSCONE et al., 1993).

Moscone et al. (1993) aplicaram, pela primeira vez no gênero, a técnica de bandeamento C em seis espécies de *Capsicum* (*C. chacoense*, *C. parvifolium*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. pubescens* e *C. campylopodium*), em que foi possível observar grande diferenciação cariotípica entre táxons quanto ao padrão de bandas. Tal padrão foi caracterizado pela presença de bandas centroméricas e número variável de bandas distais pequenas e grandes, com bandas intercaladas em alguns casos, sendo as regiões satélites sempre C-positivas. Em outro estudo, Moscone et al. (1996) utilizaram em 15 acessos de espécies domesticadas de pimentas, um conjunto de técnicas através de coloração com Giemsa, bandeamento C e bandeamento por nitrato de prata (AgNORs). Os resultados permitiram uma análise cariossistemática do gênero, na qual os padrões de bandeamento diferiram entre os citótipos, espécies e grupos, relacionando esta diferenciação cromossômica a uma divergência evolutiva entre as espécies estudadas.

Outra técnica diferencial muito utilizada em estudos citogenéticos, que detecta regiões ricas em heterocromatina, é o bandeamento através dos fluorocromos CMA/DAPI. Estes corantes fluorescentes informam a constituição da heterocromatina, detalhando o padrão de bases pelo uso do fluorocromo cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que mostram especificidade de ligação com sequências de bases de DNA GC e AT, respectivamente (GUERRA b,1988; 2000).

Moscone et al. (2007) publicaram um dos trabalhos citológicos mais relevantes para o gênero *Capsicum*, utilizando coloração convencional, bandeamento com nitrato de prata, bandeamento cromossômico com CMA /DAPI e a FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) usando sondas das sequências teloméricas das espécies estudadas, sendo possível traçar um mapa filogenético de todas as espécies estudadas, baseado exclusivamente nas suas características cariotípicas. Mais recentemente, Scaldaferrro et al. (2012) analisaram o tipo, a quantidade e a distribuição de heterocromatina em 11 táxons de pimentas através

da técnica de coloração tripla sequencial CMA/DA/DAPI, permitindo a identificação do padrão de bandas de todos os táxons analisados, o que contribuiu para o seu agrupamento taxonômico. Estes autores verificaram a ocorrência de heterocromatina terminal CMA⁺/DAPI⁻ em todos os táxons analisados, enquanto apenas *C. praetermissum* apresentou bandas CMA⁻/DAPI⁺ intercalares e distais, além de pequenas bandas CMA⁺/DAPI⁺. Além disso, a quantidade de heterocromatina variou entre 1,72% em *C. chacoense* a 16,82% em *C. flexuosum*, sendo positivamente correlacionada ao comprimento do cariótipo na maioria dos táxons analisados.

Uma outra técnica mais recente é a imunocoloração de histonas, técnica citomolecular que utiliza anticorpos que marcam um determinado aminoácido modificado na cauda N-terminal das histonas (FRANSZ et al., 2008; FUCHS et al., 2009; HÁ et al. 2011). Estas proteínas sofrem modificações pós-síntese incluindo acetilação, fosforilação, metilação, dentre outras, e que estão associadas fortemente aos mecanismos de expressão ou silenciamento gênico. A acetilação da lisina 5 na histona H4 (H4K5ac), por exemplo, é uma marca universal associada a uma maior descompactação do DNA, e tem sido observada desde protozoários, fungos, insetos até plantas e mamíferos (KIMURA et al., 2005). Esta marcação está relacionada a regiões gênicas potencialmente ativas e com a estrutura da cromatina mais descompactada. Em tomate, por exemplo, uma planta com genoma bastante estudado, relacionada ao gênero *Capsicum* e pertencente à mesma família Solanaceae, as regiões de eucromatina terminal descondensada são mais ricas em genes (TANG et al., 2008) e são fortemente acetiladas na lisina 5 da histona H4 (dados pessoais).

Já a fosforilação da serina 10 na histona H3 (H3S10f) está relacionada a mecanismos de coesão entre cromátides, condensação cromossômica, reparo do DNA e expressão gênica quando em associação com H4K5ac através de alterações na estrutura da cromatina e em suas propriedades funcionais em diversos organismos (HOUBEN et al., 2006). Em plantas, a distribuição da fosforilação da histona H3 na serina 10 na posição pericentromérica ocorre tanto na mitose como na meiose II, como observado, por exemplo, em *Hordeum vulgare*, *Vicia faba*, *Secale cereale*, *Costus spiralis* e um amplo grupo de angiospermas (HOUBEN et al., 2007; FEITOZA et al., 2011; MARCON-TAVARES et al., 2014) e parece ter um papel ainda

questionável se mais específico na condensação da cromatina ou coesão entre cromátides-irmãs ciclo celular-dependente, respectivamente.

Apesar dos esforços reunidos para o conhecimento do genoma de espécies e de acessos de *Capsicum*, ainda há poucos trabalhos no estudo da caracterização da heterocromatina com o uso de técnicas mais refinadas, como com fluorocromos CMA/DAPI, quando comparado a outros grupos de plantas de relevante importância econômica. Além disso, trabalhos envolvendo a técnica citomolecular de imunocoloração através da identificação dos padrões de histonas modificadas após sua síntese nos cromossomos de *Capsicum* são inexistentes na literatura até o momento.

Acredita-se, portanto, que a associação de dados citogenéticos clássicos e moleculares de *Capsicum* poderão fornecer informações relevantes acerca do genoma das pimentas, permitindo assim a elaboração de um amplo programa de caracterização genômica e mapeamento citomolecular das pimentas, visando aumentar o conhecimento sobre a variabilidade inter e intraespecífica, a organização genômica e da cromatina e evolução cariotípica das espécies de *Capsicum* (MOSCONE et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, foram caracterizados citogeneticamente acessos de pimentas pertencentes às espécies *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Universidade Federal do Piauí (BAGC-UFPI), conforme descritos na Tabela 1. O critério para a seleção dos acessos foi com base na sua procedência, sendo selecionados materiais dos cinco estados do nordeste brasileiro (Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte).

Tabela 1- Identificação de 13 acessos de pimentas do gênero *Capsicum* provenientes do Banco ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Universidade Federal do Piauí (BAGC - UFPI).

Nº de Identificação	Nome vulgar	Nome científico	Proveniência
BAGC 87	Murici	<i>C. chinense</i>	Codó - MA
BAGC 99	Pimenta ornamental	<i>C. annuum</i>	Teresina - PI
BAGC 104	Pimenta vermelha	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	Fortaleza - CE
BAGC 105	Pimenta de cheiro	<i>C. chinense</i>	Fortaleza - CE
BAGC 106	Pimenta malagueta	<i>C. frutescens</i>	Fortaleza - CE
BAGC 110	Dedo-de-moça	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	Teresina - PI
BAGC 111	Murici	<i>C. chinense</i>	Teresina - PI
BAGC 125	Dedo-de-moça	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	Natal - RN
BAGC 126	Pimenta malagueta	<i>C. frutescens</i>	Natal - RN
BAGC 139	Bhut jolokia	<i>C. chinense</i>	Teresina - PI
BAGC 191	Pimenta de chayenne	<i>C. frutescens</i>	Recife - PE
BAGC 193	Bode vermelha	<i>C. chinense</i>	Recife - PE
BAGC 194	Dedo-de-moça	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	Recife - PE

Fonte: BAGC-UFPI – Banco ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Universidade Federal do Piauí.

3.1 Obtenção das raízes, pré-tratamento e fixação das células

As sementes de pimentas foram germinadas em placas de Petri sobre papel filtro esterilizado e umedecido diariamente com água destilada. Ao atingirem cerca de 1 cm, as radículas foram coletadas e pré-tratadas em solução de p-diclorobenzeno (0,015 g/mL), por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram fixadas em solução Carnoy, (etanol absoluto e ácido acético glacial na proporção de 3:1 v/v), e estocadas em *freezer* a -20°C por no mínimo 12 horas.

3.2 Coloração Convencional com *Giemsa*

A metodologia convencional utilizada foi a proposta por Guerra (1983). Após a fixação em Carnoy, as raízes foram lavadas em água destilada, hidrolisadas com HCL 5N por 20 minutos e novamente lavadas em água destilada. As lâminas foram preparadas destacando pontas das radículas, que foram maceradas em ácido acético glacial a 45% e cobertas com lamínula 18x18 mm. O conjunto lâmina/lamínula foi mergulhado em nitrogênio líquido para a remoção das lamínulas e as lâminas foram secas ao ar. Logo após este procedimento, foram coradas em solução de Giemsa a 2%, por 10 minutos e montadas com Entellan (Merck®)

3.3 Bandeamento C-Giemsa

Utilizou-se a metodologia proposta por Schweizer e Ambros (1980), com modificações. As radículas foram lavadas três vezes em água destilada, por cinco minutos cada, e colocadas em solução enzimática de celulase 2% (*Onozuka R-10*) e pectinase 20% (Sigma) em câmara úmida a 37°C, por meia hora. Cada lâmina foi preparada pelo método de esmagamento, e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em ácido acético 45%, a 60° C, por 10 minutos. Em seguida, foram deixadas em solução básica de hidróxido de Bário 5%, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Por fim, foram colocadas em solução de 2x SSC (1,5M NaCl mais 0,15 M citrato trissódico dihidratado), a 60° C, por 80 minutos. Após lavagem com água destilada, foram secas, coradas com solução de Giemsa a 2%, por 10 minutos, lavadas com jato de água destilada, secas ao ar e montadas com Entellan (Merck®).

3.4 Bandeamento com fluorocromos CMA e DAPI

Para uma melhor visualização dos blocos heterocromáticos, foi realizada previamente a técnica de bandeamento C (BARROS e SILVA, GUERRA, 2009). O bandeamento CMA/DAPI seguiu o protocolo de Schweizer e Ambros (1994), com modificações. As lâminas preparadas com as enzimas celulase 2% (*Onozuka R-10*) e pectinase 20% (Sigma) foram coradas com 10 µL de CMA (0,5 mg/ml) e mantidas no escuro em câmara úmida por uma hora. Após este período, foram lavadas com água destilada e seca com bomba de ar. Posteriormente foram coradas com 10 µL DAPI (2 µg/ml) por 30 minutos, lavadas, secas e montadas em tampão McIlvaine-glicerol (1:1 v/v).

3.5 Imunocoloração utilizando anticorpos anti-H4K5ac e anti-H3S10f

A técnica de imunocoloração seguiu o protocolo descrito por Feitoza e Guerra (2011). Raízes fixadas em paraformaldeído 4% foram lavadas em PBS, 10 minutos cada, e digeridas em solução enzimática contendo 2% celulase *Onozuka R-10* (Serva) e 20% pectinase (Sigma) a 37° C, por duas horas. As lâminas selecionadas previamente com DAPI/PBS foram lavadas três vezes em PBS 1X por 5 min, incubadas em BSA 3% (w/v), contendo 0,1% Triton X-100 em PBS por 10 minutos, e em seguida foram adicionados 15 µl de anticorpo primário. Os anticorpos primários anti-H4K5ac e anti-H3S10f foram diluídos 1:300 (coelho policlonal IgG – Upstate Biotechnology, USA) em 1x PBS contendo BSA 3% e incubados *overnight* a 4°C. Para detecção do anticorpo primário, foram adicionados 15 µl do anticorpo secundário FITC conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma), diluído 1:60 em BSA 3%, por 3 horas, no escuro e à temperatura ambiente. As preparações foram montadas em DAPI (2µg/mL): Vectashield (1:1, v/v), e fotografadas logo em seguida.

3.6 Fotodocumentação e Morfometria

Os resultados obtidos pela análise convencional e pelo bandeamento C foram fotografados por meio de tablet acoplado em microscópio óptico no Laboratório de Citogenética Vegetal da UFPI (LASO-DEAS-CCA), enquanto os resultados do bandeamento CMA/DAPI e da técnica de imunocoloração foram fotografados em câmera digital Leica DFC345Fx acoplada em microscópio de epifluorescência Leica DM2500, no Laboratório de Citogenética Vegetal Aplicada da UFRPE. As imagens

tiveram alteração de brilho e contraste no programa *Adobe Photoshop CS3* com o suporte do *Paint Shop Pro 5*.

Para a morfometria, foram utilizadas imagens de cinco metáfases provenientes da coloração convencional para cada acesso. O tamanho dos cromossomos foi determinado por meio do programa *Micromesure 3.3*, complementado pelo *Microsoft Excel 2010*. O idiograma foi desenhado no programa *Corel DRAW X7*. Com os cariótipos mensurados, foi possível determinar os valores do intervalo do tamanho cromossômico (ITC), razão entre os braços longo e curto (r) de cada par cromossômico, fórmula cariotípica (FC), comprimento total cromossômico (CTC) , comprimento médio cromossômico (CMC) e comprimento total do lote haploide (CTLH) (GUERRA b, 1988).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cariotípica dos acessos de *Capsicum*, por meio da técnica de coloração convencional com Giemsa, permitiu uma descrição detalhada quanto ao tipo de núcleo interfásico, padrão de condensação profásico, número, morfologia e tamanho cromossômico (Figura 4; Tabela 2).

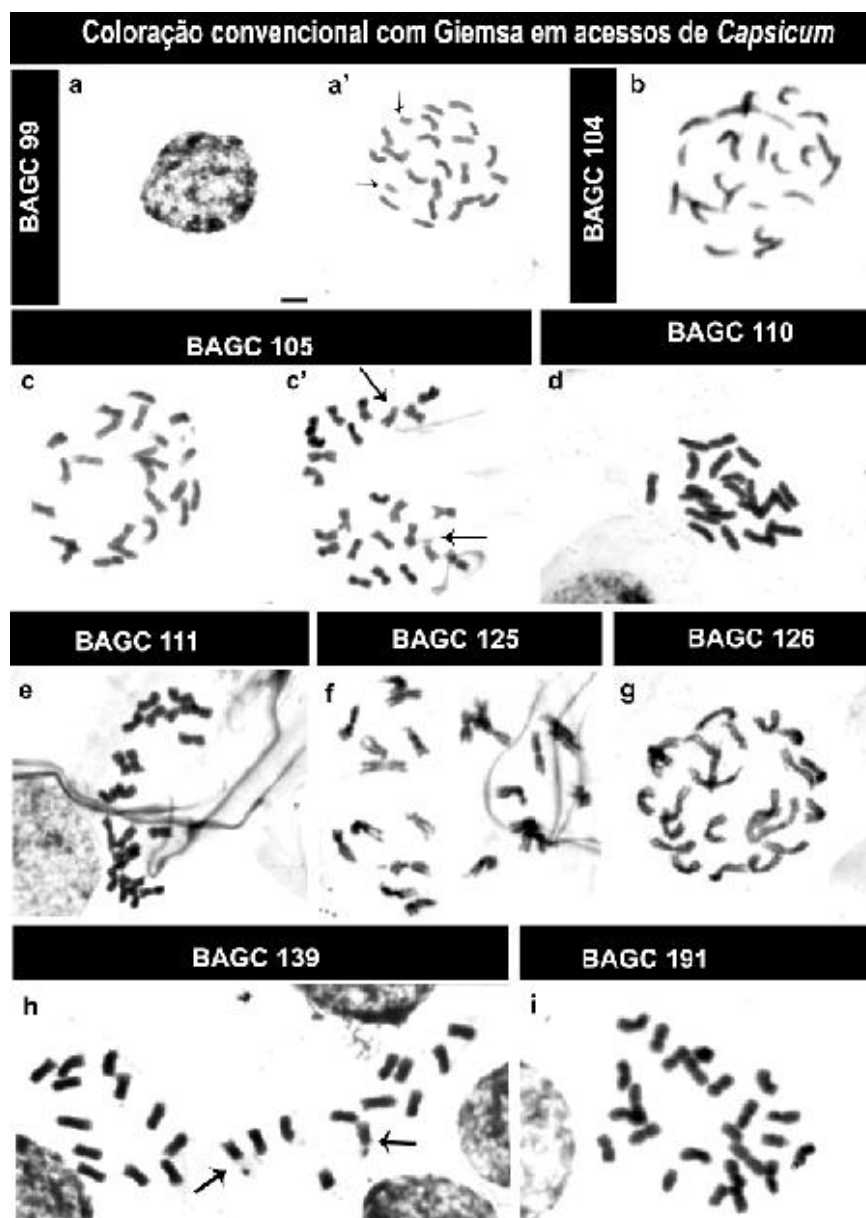


Figura 4 - Análise cariotípica em acessos de *Capsicum* sp. através da técnica de coloração convencional. a- núcleo interfásico; a'- metáfase com setas indicando par cromossômico heteropicnótico; b, c, f, g - prometáfase; c', d, e, h, i - metáfase; e- cariótipo com dois cromossomos perdidos. Setas maiores em e' e g indicam RONS. Barra representa 10 µm.

Em todos os acessos de *Capsicum*, os núcleos interfásicos foram do tipo semirreticulado (Figura 4 a) e o padrão de condensação profásico foi proximal, apresentando assim cromatina proximal de condensação precoce e cromatina terminal de condensação tardia, com regiões mais descompactadas. No acesso BAGC 99 (Figura 4 a'), conforme indicações das setas, observa-se a presença de um par cromossômico heteropicnótico, com cromatina terminal descondensada mais tardiamente em relação aos outros cromossomos do cariótipo.

O número cromossômico encontrado para todos os acessos estudados foi $2n=24$, com cariótipos simétricos e cromossomos variando de 1,96 a 5,94 μm , diferindo entre si em relação ao comprimento e à posição do centrômero (Tabela 2). Estudos citogenéticos em *Capsicum* mostraram que espécies tidas como domesticadas contêm conjunto básico cromossômico $x=12$. Contudo, outras pimentas previamente descritas para o gênero, como as silvestres *C. campylopodium*, *C. villousum* e *C. buforum*, possuem número básico $x=13$, com cariótipo mais assimétrico e provavelmente derivado do primeiro devido a uma fissão Robertsoniana (MOSCONE et al., 2007; SCALDAFERRO et al., 2012).

A maioria dos acessos (BAGC 87, 104, 110, 111, 125, 126, 139 e 193) apresentou fórmula cariotípica $11M + 1SM$ enquanto os acessos BAGC 99, 105, 106 e 191, referentes às espécies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. frutescens*, respectivamente, apresentaram fórmula cariotípica $12M$, e apenas o acesso BAGC 194, da espécie *C. baccatum* var. *pendulum* apresentou cariótipo $10M + 2SM$ (Tabela 2). Em trabalhos prévios realizados por Moscone et al. (2007), as demais espécies de *Capsicum* com $2n=24$ cromossomos, em geral, demonstraram ter cariótipo $11M + 1ST$, com exceções para os citótipos das espécies *C. parifolium*, com $12M$, *C. annuum* var. *glabriusculum* e var. *annuum*, com $10M + 1 SM + 1 ST$, *C. eximium*, *C. cardenarri* e *C. tovarii*, com $11M + 1 SM$. Moscone (1990) e Moscone et al. (1993, 2007) relatam que estas diferenças na morfologia, no tamanho e no número cromossômico são frequentes em populações da mesma espécie ou em táxon interespecíficos de plantas *Capsicum*, sendo denominados citótipos ou raças cromossômicas. Já para Teodoro-Pardo et al. (2007), as diferenças nas fórmulas cariotípicas entre pimentas podem estar relacionadas às variações genéticas entre as populações em resposta aos diferentes ambientes, condição que favorece o aumento da variabilidade genética entre plantas deste gênero.

Tabela 2 – Número cromossômico diploide, intervalo do tamanho cromossômico (ITC), média da razão entre os braços do cromossomo (r), fórmula cariotípica (FC), comprimento total cromossômico (CTC), comprimento médio cromossômico (CMC), comprimento total do lote haploide (CTLH) e número de bandas CMA/DAPI (CMA₃/DAPI). ++ representa bandas CMA mais fortemente coradas e bandas +, bandas CMA mais fracamente coradas. ⁰ representa banda AT neutra e -, banda AT reduzida.

Acesso	Nome científico	2n	ITC μm	r	FC	CTC μm	CMC μm	CTLH μm	CMA ₃ /DAPI
BAGC 87	<i>C. chinense</i>	24	2,21 – 4,57	1,29	11 M + 1 SM	83,03	3,46	41,52	-
BAGC 99	<i>C. annuum</i>	24	2,34 – 4,92	1,12	12 M	89,27	3,72	44,64	2 CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻ 2 CMA ⁺ /DAPI ⁰
BAGC 104	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	24	2,58 – 5,48	1,26	11 M + 1 SM	100,47	4,19	50,24	2 CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻ 10 CMA ⁺ /DAPI ⁻
BAGC 105	<i>C. chinense</i>	24	2,80 – 4,75	1,25	12 M	94,82	3,95	47,41	2 CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻ 2 CMA ⁺ /DAPI ⁻
BAGC 106	<i>C. frutescens</i>	24	2,27 – 4,49	1,24	12 M	80,14	3,34	40,07	-
BAGC 110	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	24	3,61 – 5,49	1,27	11 M + 1 SM	111,7	4,65	55,85	4 CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻ 6 CMA ⁺ /DAPI ⁰
BAGC 111	<i>C. chinense</i>	24	2,04 – 4,27	1,2	11 M + 1 SM	70,75	2,95	35,38	2 CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻ 2 CMA ⁺ /DAPI ⁰
BAGC 125	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	24	3,24 – 5,85	1,2	11 M + 1 SM	117,56	4,9	58,78	-
BAGC 126	<i>C. frutescens</i>	24	2,34 – 5,05	1,28	11 M + 1 SM	90,80	3,78	45,4	4 CMA ⁺ /DAPI ⁰
BAGC 139	<i>C. chinense</i>	24	3,56 – 5,94	1,23	11 M + 1 SM	110,85	4,62	55,43	-
BAGC 191	<i>C. frutescens</i>	24	1,96 – 3,63	1,27	12 M	66,55	2,77	33,28	2 CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻ 4 CMA ⁺ /DAPI ⁰
BAGC 193	<i>C. chinense</i>	24	2,08 – 5,09	1,27	11 M + 1 SM	83,25	3,47	41,63	2 CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻ 2 CMA ⁺ /DAPI ⁰
BAGC 194	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	24	2,22 – 4,87	1,29	10 M + 2 SM	87,87	3,66	43,93	6 CMA ⁺⁺ /DAPI ⁻ 12 CMA ⁺ /DAPI ⁰

O intervalo do tamanho cromossômico (ITC) dos acessos diploides variou de 1,96 (BAG 191) a 5,94 μm (BAGC 139), enquanto o comprimento total cromossômico (CTC) variou de 66,55 (BAG 191) a 117,56 μm (BAGC 125) (Tabela 2). Esses resultados divergem de dados encontrados por Moscone et al. (1996), que, ao analisarem o tamanho cromossômico total de espécies domesticadas de *Capsicum*, observaram variação de 122,62 μm em *C. chinense* a 148,62 μm em *C. baccatum* var. *pendulum*. Similarmente, pesquisas realizadas em cromossomos metafásicos de acessos de *C. annuum*, provenientes de bancos de germoplasma de *Capsicum* do México, indicaram alto polimorfismo no comprimento cromossômico total, demonstrando mais uma vez ampla diversidade entre os representantes desta espécie (TEODORO-PARDO et al., 2007; ROHAMI et al., 2010). Segundo Moscone (1990), a diferença em relação ao tamanho cromossômico entre plantas de uma mesma espécie deste gênero também pode ser atribuída a um grau desigual de compactação cromossômica durante a divisão celular. Para Ranganathan e Jagatheeswari (2013), a diferença de tamanho cromossômico encontrada entre representantes de uma mesma espécie de pimenta pode estar relacionada à quantidade de DNA repetitivo presente em cada genoma.

As regiões organizadoras de nucléolo (RONS) distendidas foram observadas apenas nos acessos BAGC 105, 110, 139 e 191, referentes às espécies *C. chinense*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, respectivamente. Rohami et al. (2010) citam que em todos os genótipos de *C. annuum* estudados, verificou-se a presença de pelo menos um par de RON localizada no braço curto do par cromossômico, enquanto Ranganathan e Jagatheeswari (2013), ao analisarem cromossomos mitóticos de *C. frutescens*, não observaram nenhuma constrição secundária em seus cromossomos. Para Pozzobon et al. (2006), as diferenças observadas na morfologia do par cromossômico com satélite dentro e entre as espécies podem sugerir diferenças biológicas, podem estar relacionadas ao padrão de condensação cromossômica ou apenas ser reflexo das diferenças entre as técnicas utilizadas, como o antimitótico utilizado ou tempo de pré-tratamento, como também observado no presente trabalho.

A coloração convencional, apesar de distinguir regiões heteropicnóticas tanto de heterocromatina como de eucromatina condensada, não é um método utilizado para identificar as regiões ricas em heterocromatina constitutiva

(BRASILEIRO-VIDAL et al., 2009). Estas regiões podem ser identificadas através de outras técnicas citológicas, como o bandeamento C-Giemsa e bandeamento com fluorocromos base-específicos, que podem revelar diferentes frações do seu conteúdo heterocromático. Em *Costus*, tomate, cacau e várias outras plantas com genoma pequeno (GUERRA a, 1988; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2009; DANTAS; GUERRA, 2010), por exemplo, apenas uma pequena fração dos blocos precocemente condensados em prófase e positivamente corados pela coloração convencional é banda-C positiva. Segundo Guerra (2000), a análise do padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva (HC) possibilita a verificação de bandas localizadas em certas regiões cromossômicas específicas, sugerindo assim um propósito funcional desta heterocromatina, além da identificação de pares cromossômicos homólogos e seu heteromorfismo dentro de cada táxon estudado.

Na análise do padrão de distribuição da HC dos acessos de *Capsicum* através do bandeamento C-Giemsa, foram observados blocos heterocromáticos variáveis quanto ao número, tamanho e posição nos cromossomos dos cariótipos analisados (Figura 5).

Nos cinco acessos (BAGC 104, 105, 110, 111 e 193) os núcleos interfásicos apresentaram blocos fortemente marcados, que puderam ser confirmados nas suas respectivas metáfases (Figura 5). Todos os acessos apresentaram, pelo menos dois blocos heterocromáticos, provavelmente referentes ao DNAr, e blocos menores de difícil identificação. Além disso, as bandas C foram observadas majoritariamente nas regiões terminais e subterminais dos cromossomos, sendo identificadas algumas bandas pericentroméricas e intercalares de difícil detecção.

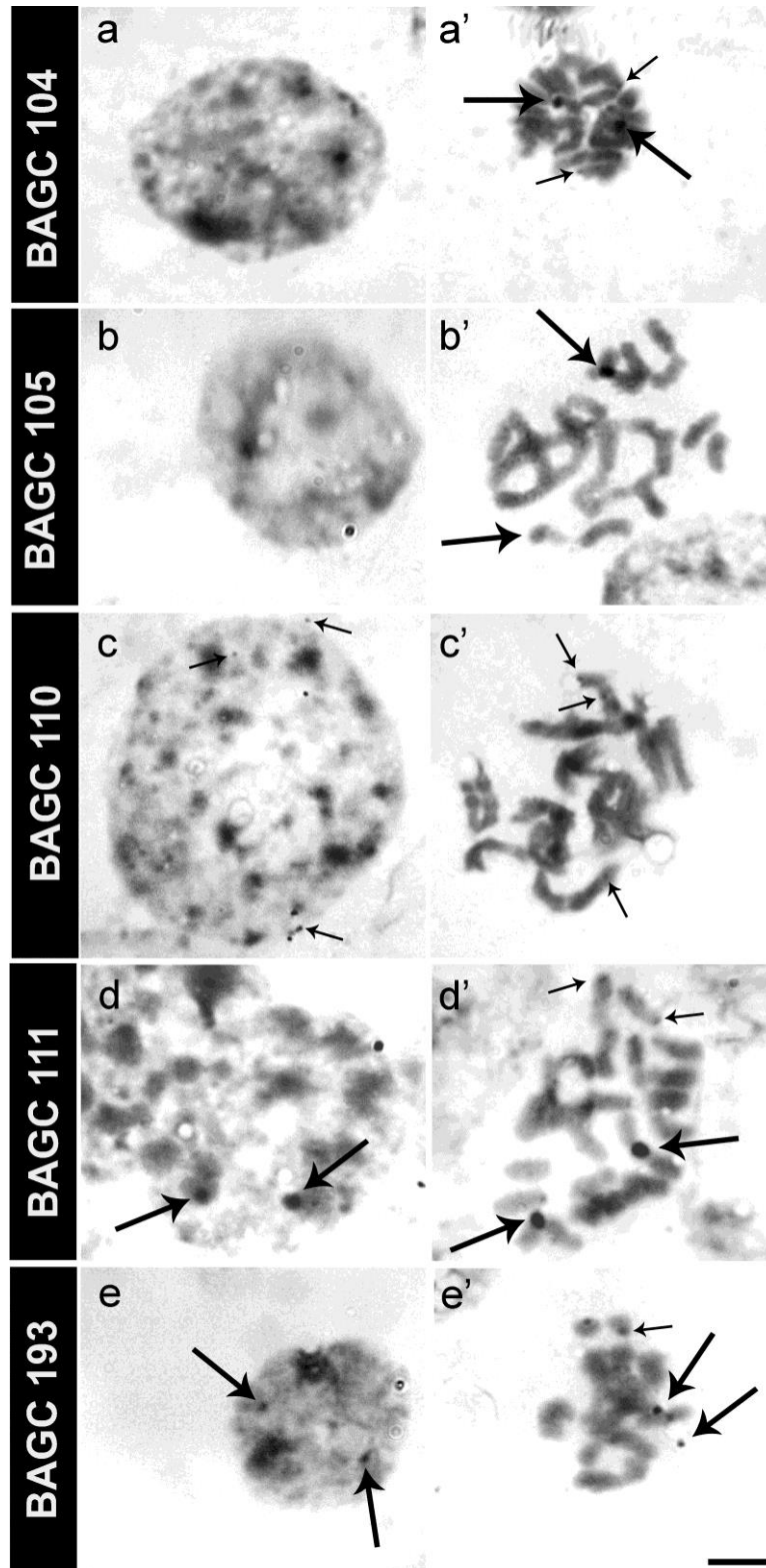


Figura 5 - Análise de cinco acessos de *Capsicum* sp. através da técnica de bandeamento C-Giemsa. a – e - núcleos interfásicos; c'- prometáfase; a',b',d',e'-metáfase. Setas maiores indicam grandes blocos heterocromáticos e setas menores indicam pequenos blocos heterocromáticos. Barra representa 10 μ m.

Segundo Guerra (2000), a quantidade de heterocromatina não é homogênea entre e dentro espécies e pode apresentar polimorfismo quanto ao número e tamanho das suas bandas. Além do mais, a distribuição destas bandas parece depender, em partes, do tamanho cromossômico. Em cromossomos pequenos, como em *Arachis* sp e *Helianthus* sp, são encontradas comumente bandas proximais heterocromáticas equilocais e, de acordo com o aumento do tamanho cromossômico, como observado em *Capsicum* sp, *Vicia* sp e *Fortuniatia* sp, as bandas proximais diminuem de frequência. De fato, Moscone et al. (1993), ao realizarem o bandeamento C-Giemsa em espécies silvestres e domesticadas de *Capsicum*, observaram um padrão de bandeamento caracterizado pela presença de bandas centroméricas e um número variável de bandas distais pequenas e grandes, além de bandas intercalares distribuídas de forma desigual nos dois braços cromossômicos.

Os mesmos autores separaram as espécies domesticadas em dois grupos de acordo com a quantidade de bandas C. As espécies domesticadas *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, pertencentes ao grupo de flores brancas, apresentam baixo conteúdo de heterocromatina e bandas terminais pequenas e bandas intercalares ausentes, diferentemente do grupo de flores púrpuras, que inclui as espécies *C. campylopodium* e *C. pubescens*, que apresentam alto conteúdo de heterocromatina, grandes bandas teloméricas e blocos intercalares presentes. Apesar de *C. baccatum* pertencer a um subgrupo de flores brancas juntamente com *C. praetermissum*, destacam-se por apresentar maior complexidade quanto ao padrão de bandeamento heterocromático e maior tamanho cariotípico, ocupando assim uma posição mais distante em relação às outras três espécies domesticadas. (Figura 3).

Além da técnica de bandeamento C, outro tipo de marcação mais simples e reprodutível quanto à composição e distribuição das regiões de HC foi realizada através da dupla coloração com fluorocromos CMA e DAPI. Em relação ao padrão heterocromático, diferenças significativas foram observadas nos nove acessos analisados, para os quais foram encontrados três tipos de heterocromatina: heterocromatina altamente rica em GC e reduzida em AT (CMA⁺⁺/DAPI⁻); heterocromatina moderadamente rica em GC e reduzida em AT (CMA⁺/DAPI⁻); heterocromatina moderadamente rica em GC e neutra em AT (CMA⁺/DAPI⁰) (Tabela 2; Figura 6).

Em todos os acessos, pelo menos um par de bandas CMA foi observada, possivelmente correspondendo à RON terminal ou subterminal, além de bandas terminais mais evidentes e bandas pericentroméricas menores de difícil detecção. Nos acessos BAGC 99, 105, 111 e 193, sendo o primeiro referente à espécie *C. annuum* e os demais à espécie *C. chinense*, foram visualizadas quatro bandas CMA em dois pares dos cromossomos, sendo pelo um par de bandas maiores CMA⁺⁺ e um par de bandas menores CMA⁺. O acesso BAGC 126, da espécie *C. frutescens*, também apresentou quatro bandas CMA, sendo todas CMA⁺⁺. Apenas o acesso BAGC 191 (*C. frutescens*), apresentou 6 bandas, sendo duas bandas CMA⁺⁺/DAPI⁻ provavelmente correspondente à RON, e quatro bandas adicionais menores CMA⁺/DAPI⁰. Além disso, os acessos que apresentaram um maior número de bandas heterocromáticas foram os acessos BAGC 110, 104 e 194, com 10, 12 e 18 bandas variáveis de CMA⁺⁺/DAPI⁻ e CMA⁺/DAPI⁰, respectivamente, sendo os três identificados como *C. baccatum* var. *pendulum*. No acesso BAGC 194, por sua vez, foram identificados cinco pares com marcação terminal em um dos braços cromossômicos, e dois pares com marcação terminal em ambos os braços. Nenhum acesso apresentou bandas DAPI⁺. Para uma maior clareza e percepção quanto ao padrão de bandas fluorescentes, bem como o tamanho e morfologia de cada par cromossômico, o esquema do conjunto haploide foi representado em idiogramas (Figura 7).

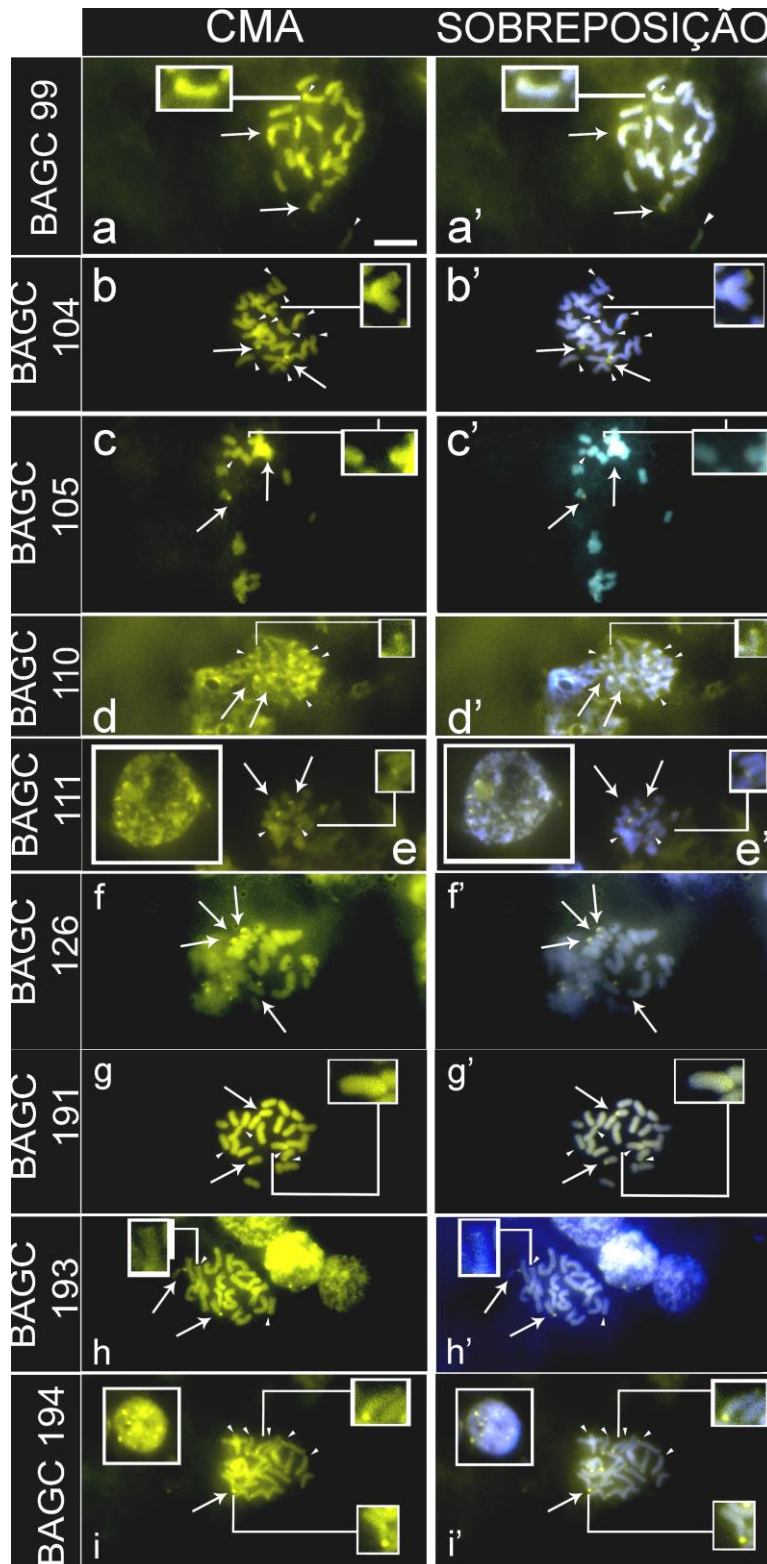


Figura 6 - Dupla coloração CMA/DAPI em acessos de *Capsicum* sp. a' - i' - sobreposição de metáfases mitóticas; e e i - sobreposição de CMA/DAPI dos núcleos interfásicos. Setas indicam grandes blocos CMA⁺⁺. Cabeças de seta indicam pequenos blocos CMA⁺ de difícil visualização, sendo ampliados em todos os inserts. Em azul (DAPI), e em amarelo (CMA). Barra representa 10µm.

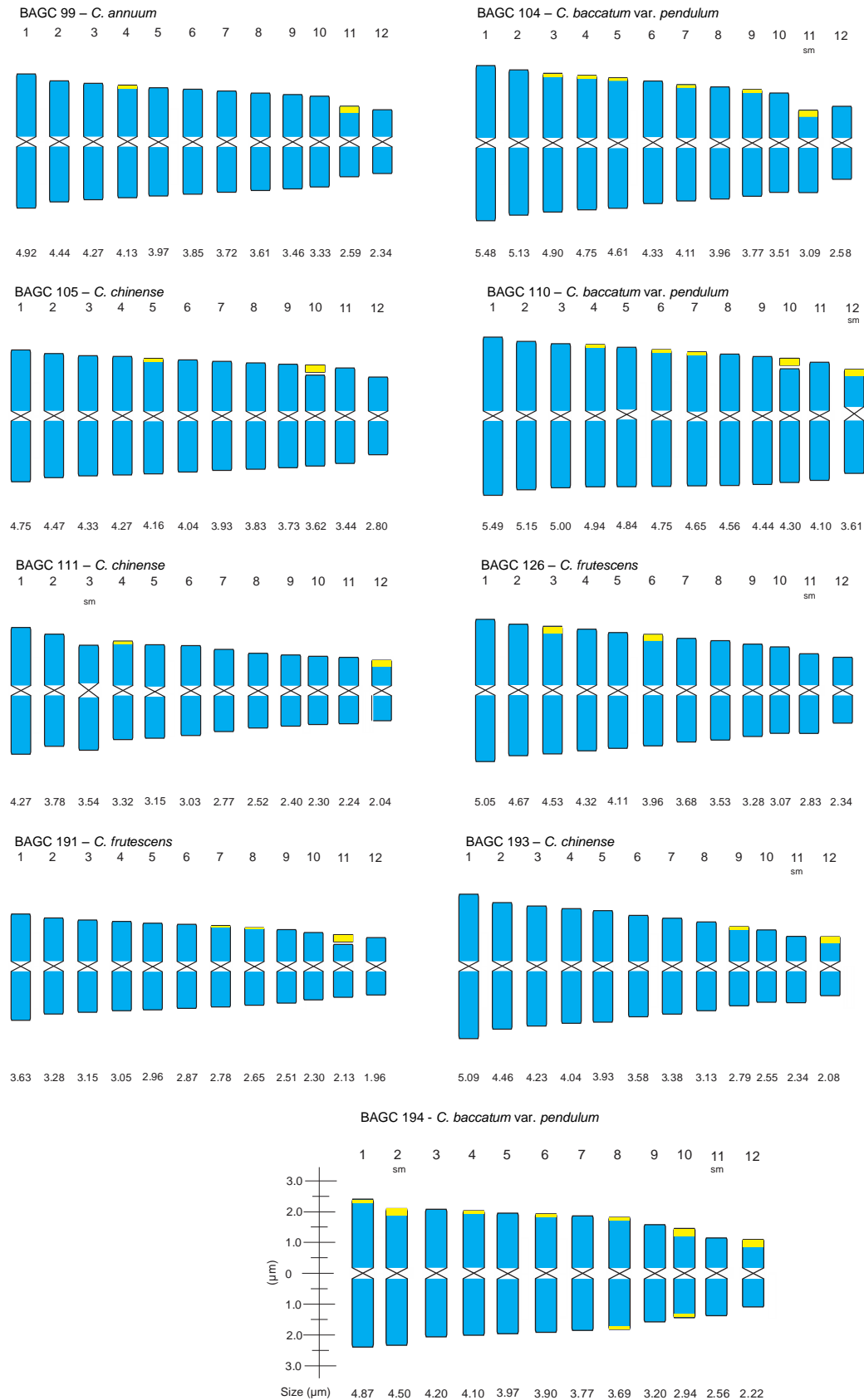


Figura 7 - Idiograma representando o tamanho, morfologia e distribuição de bandas terminais CMA⁺⁺ (bandas amarelas maiores) e bandas CMA⁺ (bandas amarelas menores) em cada cromossomo dos acessos de *Capsicum* pertencentes ao BAGC – UFPI.

Embora presentes em maior quantidade, as bandas fluorescentes observadas foram similares às marcações através do bandeamento C. Estes dados estão de acordo com Moscone et al. (1996; 2007) e Scaldaferrro et. al (2012), que, além dos blocos citados, também encontraram diferentes blocos terminais e intercalares do tipo CMA⁻/DAPI⁺ e CMA⁺/DAPI⁺ em espécies silvestres, como *C. praetermissum*, o que reflete diferentes classes de sequências de DNA repetidas em tandem no genoma de *Capsicum*. Em muitas espécies de plantas, inclusive nas solanáceas *Cestrum fasciculatum* e *Solanum lycopersicum*, bandas fluorescentes adicionais foram encontradas em sítios não detectados pelo bandeamento C (BERG; GREILHUBER, 1993; GUERRA, 2000), indicando assim uma maior eficácia na detecção de bandas heterocromáticas pelo bandeamento CMA/DAPI em relação ao bandeamento C.

Segundo Guerra (2000), em espécies do gênero *Capsicum*, bandas ricas em GC são bastante diversas e dominantes, ou até mesmo exclusivas, e correspondem à RON associada à heterocromatina constitutiva nas regiões terminais ou a sítios de DNAr não identificados. Em *Capsicum* (MOSCONE et al., 2007) e em *Solanum lycopersicum* (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2009), por exemplo, blocos heterocromáticos maiores observados pelo bandeamento CMA/DAPI corresponderam às marcações de DNAr 45S detectados através da FISH, indicando que a constrição secundária é correspondente ao maior par heterocromático do cariótipo da espécie. Bandas heterocromáticas equilocais marcadas da mesma forma com fluorocromos sugerem que a maioria dessas bandas é constituída das mesmas ou de repetições de bases similares. Já a heterocromatina pericentromérica é identificada apenas como bandas fracas indistintas de CMA⁺ (MOSCONE et al., 1996).

O bandeamento cromossômico fluorescente relevou, portanto, que heterocromatina rica em GC é universal em *Capsicum*, aparecendo em todos os táxons com $x=12$ e está localizada majoritariamente nas regiões terminais, podendo também ocorrer em números variáveis de bandas pequenas distais e intercalares de difícil detecção, como observado nas espécies *C. chacoense*, *C. annum* var. *glabriusculum*, *C. recurvatum*, *C. villosum* e *C. flexuosum* (SCALDAFERRO et al., 2012).

Na maioria das espécies de *Capsicum* analisadas, a quantidade de bandas fluorescentes está relacionada ao comprimento cariotípico e ao tamanho do

genoma, como também observado por Moscone et al. (1996; 2007). Os acessos que apresentaram maiores comprimentos cromossômicos e/ou uma maior quantidade de bandas heterocromáticas ricas em GC, incluíram BAGC 104, 110 e 194, sendo todos pertencentes à espécie *C. baccatum* var. *pendulum*.

Segundo Moscone et al. (2007), esta variedade, que está em um agrupamento taxonômico diferente e mais derivado dentre as espécies com pouca heterocromatina, exibe um aumento no tamanho do cariótipo e no conteúdo do DNA, 3 ou 4 RONS ativas por conjunto haploide, aumento da quantidade e complexidade da heterocromatina rica em GC em comparação às outras espécies domesticadas pertencentes ao complexo *C. annuum* (Figura 3) que, por sua vez, apresentam menor tamanho cariotípico, menor quantidade de heterocromatina e menor padrão de complexidade em relação às suas bandas.

Para uma melhor compreensão quanto aos padrões da estrutura da cromatina, foi realizada, pela primeira vez no gênero *Capsicum*, a técnica de imunocoloração utilizando anticorpos contra histonas modificadas, através da acetilação da lisina 5 na histona 4 (H4K5ac) e a fosforilação da serina 10 na histona H3 (H3S10f).

A marcação com anti-H4K5ac ocorreu na cromatina difusa dos núcleos e na eucromatina terminal descondensada dos cromossomos desde prófase até metáfase bem condensada, não apresentando relação com as fases do ciclo celular, e parece estar associada a fatores permanentes da sua estruturação cromossômica (Figura 8). Os cromocentros e algumas regiões terminais cromossômicas que contém a fração heterocromática não foram marcados. Este mesmo padrão de marcação foi identificado em todos os cinco acessos analisados BAGC 104, 111, 191, 193 e 194, referentes às espécies *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum* var. *pendulum*.

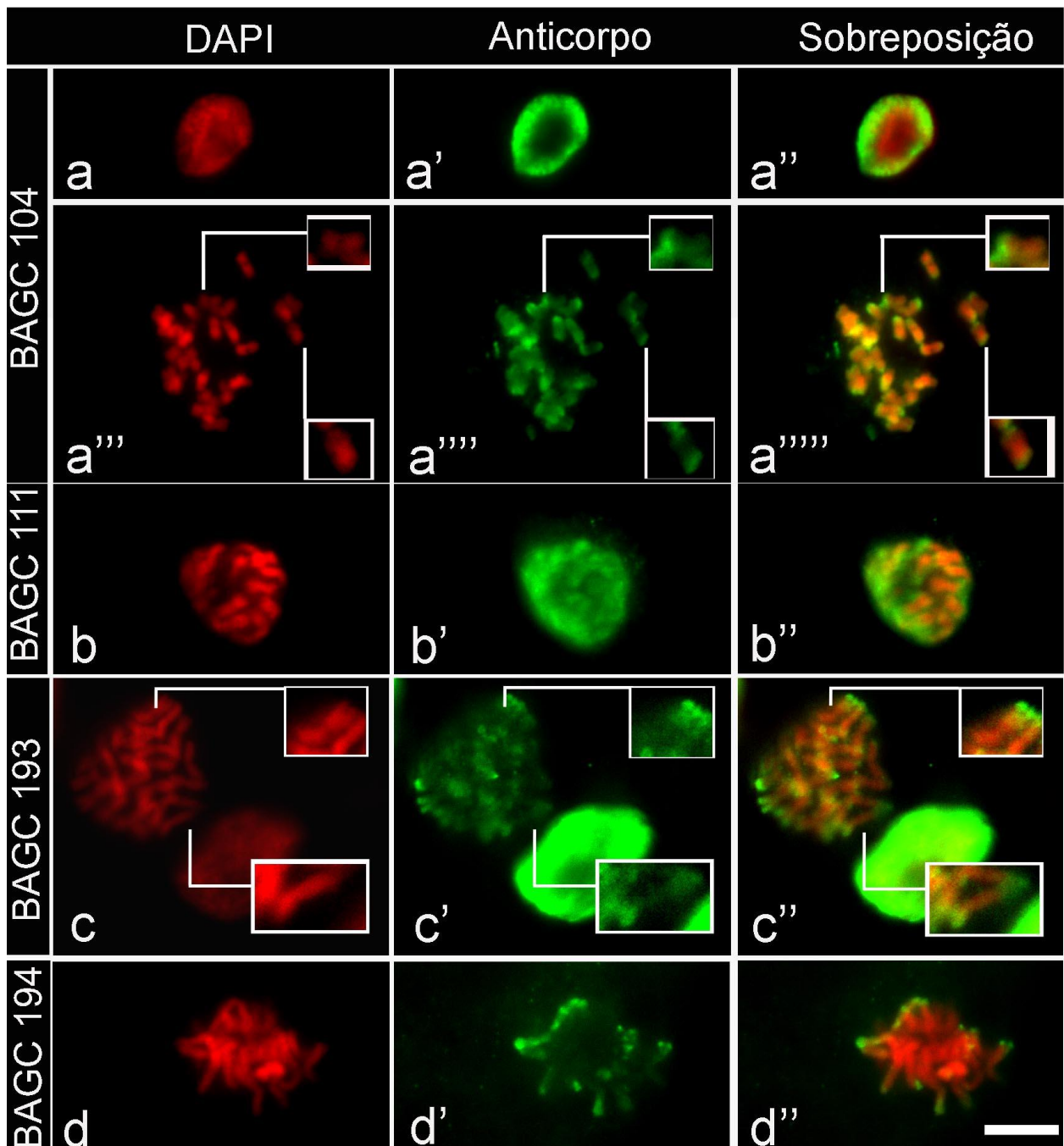


Figura 8 - Padrão de marcação com o anticorpo anti-H4K5ac em acessos de *Capsicum* sp. a - a'' – núcleo interfásico; b - b''- prófase; b''' – b'''' – prometáfase; a''''', c'', d'''- sobreposição de metáfase mitótica, mostrando a cromatina terminal fortemente marcada (verde) em relação à cromatina condensada (vermelho). Insertos superiores indicam cromossomo com região fortemente acetilada em um único braço terminal, enquanto insertos inferiores indicam cromossomo regiões terminais fortemente acetiladas em ambos os braços. DAPI pseudocorado em vermelho e anti-H4K5ac (verde). Barra representa 10 μ m.

O padrão de histonas anti-H4K5 observado em *Capsicum* sugere uma diferenciação similar ao que ocorre em outras plantas com padrão de condensação bem conhecido, cuja relação entre a eucromatina terminal descondensada e o anticorpo H4K5ac encontra-se bem estabelecido, como em *Costus spiralis*, *Eleutherine bulbosa* (FEITOZA e GUERRA, 2011) e *Phaseolus vulgaris* (FONSECA et al., 2014). O fato de a marcação anti-H4K5 estar presente em todas as fases do ciclo celular novamente sugere uma estreita relação com o estado de compactação e dinâmica da cromatina (FUCHS et al., 2006). Assim, em cariótipos variando de pequeno a médio e com padrão de condensação diferencial semelhante ao de *Capsicum*, a distribuição das regiões hiperacetiladas coincide, portanto, com as regiões eucromáticas tardiamente condensadas (Figura 4 a'), enquanto blocos de cromatina profásica precocemente condensada e de heterocromatina são hipoacetilados independentemente da sua localização, sugerindo que o padrão de acetilação é inversamente relacionado ao padrão heterocromático (DHAR et al., 2009).

Uma vez que a acetilação de histonas H4 na lisina 5 é uma marca universalmente associada à expressão gênica (HOUBEN et al., 2006; LENNARTSSON; EKWALL, 2009), acreditamos que este padrão de marcação na eucromatina mais descompactada apresente certa correlação com as regiões mais ricas em genes e potencialmente ativas dos cromossomos de *Capsicum*, similar ao sugerido para outros grupos de plantas, como o tomate (CIGLIANO et al., 2013), *Silene*, *Allium cepa* (CHANG et al., 2008; VYSKOT et al., 1999) e em várias outras espécies com padrão de condensação similar, bem como em inseto (WOLF; TURNER, 1996) e em mamíferos (DROUIN; HOLMQUIST, 1994).

Por fim, a marcação com anti-H3S10f foi intensa apenas na região pericentromérica dos cromossomos, em todos os acessos analisados (Figura 9). Os núcleos interfásicos, por sua vez, não foram corados (Figura 9 a - a''). Esta é uma modificação que apareceu apenas na metáfase mitótica, e está associada à condensação mitótica e/ou à coesão entre cromátides, independente das regiões de eu- e heterocromatina. Similarmente, em *Cestrum strigilatum*, outra solanáceae, a marcação com anti-H3S10f ocorreu apenas na região pericentromérica dos

cromossomos A, embora uma exceção tenha sido observada nos cromossomos B da espécie (FERNANDES, et al., 2008).

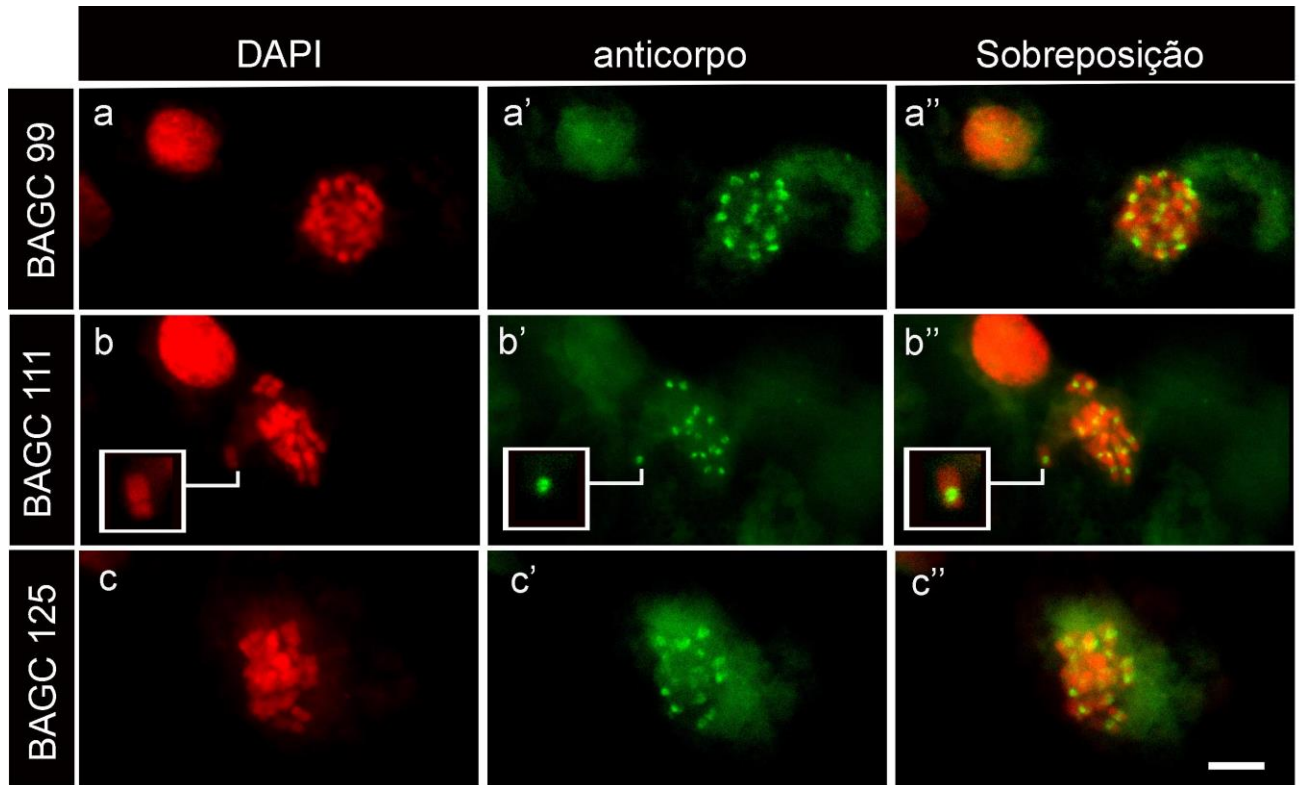


Figura 9 - Marcação com o anticorpo anti-H3S10f em acessos de *Capsicum* pertencentes ao BAGC – UFPI. Observa-se intensa marcação do anticorpo (em verde) na região pericentromérica (inserto em b). Núcleos interfásicos no canto esquerdo de a e b não foram marcados. DAPI pseudocorado em vermelho e anti-H3S10f em verde. Barra representa 10 μ m.

Estes resultados, associados a trabalhos previamente realizados em outras espécies de importância econômica, reforçam a ideia de que a acetilação da histona H4 na lisina 5 pode ser usada como um marcador cromossômico para a detecção de regiões potencialmente ricas em genes, embora em casos especiais, também ocorra marcação de heterocromatina centromérica DAPI⁺, como em *Costus spiralis* (FEITOZA e GUERRA, 2011) e em cevada (WAKO et al., 2002). Já a fosforilação da histona H3 na serina 10 parece estar envolvida na regulação da manutenção da coesão entre cromátides, sendo necessários estudos mais aprofundados para sua melhor compreensão (FUCHS et al., 2006).

5 CONCLUSÕES

As técnicas citogenéticas clássicas de coloração convencional e bandeamentos C e CMA/DAPI, associadas à técnica molecular de imunocoloração, permitiram uma análise citomolecular detalhada dos acessos de *Capsicum* pertencentes ao BAGC-UFPI, sendo observados polimorfismos cromossômicos quanto à morfometria e ao padrão de bandejamento heterocromático, permitindo assim diferenciar individualmente os acessos analisados.

Os acessos BAGC 104, 110, 125 e 194, todos pertencentes à espécie *C. baccatum* var. *pendulum*, apresentaram diferenças significativas quanto ao tamanho e/ou ao padrão de bandejamento heterocromático em relação às demais espécies domesticadas *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*. Esta espécie está em um agrupamento taxonômico distinto e mais derivado, e exibe características particulares como o aumento do tamanho cariotípico e o aumento da complexidade do padrão de heterocromatina.

Esta caracterização citomolecular foi, portanto, de relevante importância ao BAGC-UFPI, pois os dados gerados forneceram informações genéticas acerca das características do conjunto cromossômico das espécies analisadas, seus padrões de estrutura da cromatina e identificação de regiões cromossômicas ricas em genes, proporcionando subsídios aos programas de melhoramento genético voltados para este gênero, além de admitir uma comparação citológica direta com outras espécies cultivadas e silvestres descritas previamente e de igual interesse econômico.

REFERÊNCIAS

- THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399–436, 2003.
- ASSUNÇÃO, P. E. V. Dispendios e viabilidade econômica da produção de pimenta no sul de Goiás. *Revista de Política Agrícola*, Brasília, DF, ano 22, n. 3, p. 110-118, jul./ago./set. 2013.
- BARBOZA, G. E.; BIANCHETTI, L.B. Three New Species of *Capsicum* (Solanaceae) and a Key to the Wild Species from Brazil. **Systematic Botany**, v. 30, p. 863-871, 2005.
- BENKO-ISEPPON, A. M. **Estudos moleculares e citogenéticos no Caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas**. EMBRAPA - Documentos 56, p.327-332, 2001.
- BENTO, C. S.; SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E.M.; PEREIRA, M.G. Descritores qualitativos e multialegóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. **Scientia Agraria**, v. 8, p. 149-156, 2007.
- BERG, C; GREILHUBER, J. Cold-sensitive chromosome regions and heterochromatin in *Cestrum* (Solanaceae): *C. strigillatum*, *C. fasciculatum* and *C. elegans*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 18, p. 133-151. 1993.
- BIANCHETTI, L. B.; CARVALHO, S. I. C. **Subsídio à coleta de germoplasma de espécies de pimenta e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. In: WALTER, B. M.T.; CAVALCANTE, T.B. (Ed.). Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p.335-385, 2005.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; MELO-OLIVEIRA, M.B.; CARVALHEIRA, G. M. G.; GUERRA, M. Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. **Micron**, v. 40, p. 851-859, 2009.
- BÜTTOW, M. V.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S.; HEIDEN, G.; CARVALHO, F. I. F. Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1264-1269, jun, 2010.
- CARVALHO, S.I.; BIANCHETTI, L.B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças. Cap. 5, p. 39-54, 2008.
- CIGLIANO, R. A.; SANSEVERINO, W.; CREMONA, G.; ERCOLANO, M, R.; CONICELLA, C.; CONSIGLIO, F. M. Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato: gaining and insight into their developmental roles. **BMC Genomics**, v. 14, p. 57, 2013.

CHANG, S. B.; YANG, T. J.; DATEMA, E.; VUGT, J. V.; VOSMAN, B.; KUIPERS, A.; MEZNIKOVA, M.; SZINAY, D.; LANKHORST, R. K.; JACOBSEN, E.; JONG, H. FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. **Chromosome Research**, v.16, p. 919-933, 2008.

CROSBY, K. M.; Pepper. In: PROHENS, J; NUEZ, F; CARENAM, J. (eds). **Vegetables II**, 1st edn. Springer, New York, p.221–248, 2008.

DANTAS, L. G.; GUERRA, M. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 94-98, 2010.

DHAR, M. K.; FUCHS, J.; HOUBEN, A. Distribution of Eu- and Heterochromatin in *Plantago ovata*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 125, n. 3, p. 235-240, 2009.

DOUIN, R.; HOLMQUIST, G. P. High-Resolution replication bands compared with morphologic G-and R-bands. **Advances Human Genetics**, v. 22, p. 47-115, 1994.

EMBRAPA HORTALIÇAS, **Sistema de produção 2**. ISSN 1078-880x. Versão eletrônica. 2007.

ESTEVES, M. **As novas variedades de pimenta da Embrapa e o mercado pimenteiro: oportunidade de renda para agricultores**. Embrapa Hortaliças, 2011.

FEITOZA, L.; GUERRA, M. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. **Genetica**, v. 139, p. 305-314. 2011.

FERNANDES, T.; YUYAMA, P. R.; MORAES, A.P.; VANZELA, A. L. L.; An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. **Genome**, v. 51, n. 9, p. 772-777, 2008.

FONSECA, A.; RICHARD, M. M.S.; GEFFROY, V.; PEDROSA-HARAND, A. Epigenetic Analyses and the Distribution of Repetitive DNA and Resistance Genes Reveal the Complexity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) Heterochromatin. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 143, p. 168–178, 2014.

FUCHS, J.; DEMIDOV, D.; HOUBEN, A.; SCHUBERT, I. Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. **Trends in Plant Science**, v.11, n. 4, p.199-208, 2006.

FRANSZ, P.; DE JONG, J. H. Chromatin dynamic in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p. 560-567, 2012.

GUERRA, M. O uso de Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciência e Cultura**, v. 35, p.190-193, 1983.

GUERRA, M. S. a Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae) **Plant Systematic and Evolution**, v. 158, p. 107-115. 1988.

GUERRA, M. b. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 142p. 1988.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p.1029-1041, 2000.

GUERRA, N. A. Estudios cromosômicos de cuatro selecciones de *Capsicum chinense* Jacq. **Revista UDO Agrícola**, v.1, n.1, p. 34-41, 2001.

HA, M.; NG, W.-K. D.; LI, W.; CHEN, Z. J. Coordinated histone modifications are associated with gene expression variation within and between species. **Genome Research**, v. 21, p. 590-598, 2011.

HAVERROTH, M.; NEGREIROS, P. R.M. Calendário agrícola, agrobiodiversidade e distribuição espacial de roçados Kulina (Madeja), Alto Rio Envira, Acre, Brasil. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 11, n. 2, p. 299-308. 2011.

HOUBEN, A.; BELYAEV, N. D.; TURNER, B. M.; SCHUBERT, I. Differential immunostaining of plant chromosome by antibodies recognizing acetylated histone H4 variants. **Chromosoma**, v.4, p.191-194. 2006.

HOUBEN, A., DEMIDOV, D., CAPERTA, A.D., KARIMI, R., AGUECI, F., VLASENKO, L. Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. **Biochimica et Biophysica Acta** 1769, 308–315.2007

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum**. Rugell: A.R.G. Gantner Verlag. 500p. 2001.

IBIZA, V. P.; CANIZARES, J; NUEZ, F. EcoTILLING in *Capsicum* species: searching for new virus resistances. **BMC Genomics**, v. 11, p. 631, 2010.

KIM, J. S.; AHN, J.; LEE, S. J.; MOON, B.; HA, T.Y.; KIM, S. Phytochemicals and antioxidant activity of fruits and leaves of paprika (*Capsicum annuum* L., var. special) cultivated in Korea. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 193-198, 2011.

KIMURA, et al. A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. **Journal of Biochem.** v. 138, p. 647-662, 2005.

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

MACIEL- ZAMBOLIM, E.; CAPUCHO, H. C. A. S.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A. K.; KITAJIMA, E. W. Surto epidemiológico de Pepper yellow mosaic virus em tomateiro na região serrana do estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 325-327, 2004.

- MARCON-TAVARES, A.; FELINTO, F.; FEITOZA, L.; BARROS e SILVA, A.E.; GUERRA, M. Different patterns of chromosomal histone H3 phosphorylation in land plants. **Cytogenetic and Genome Research**. 2014.
- MARTINS, K. C.; PEREIRA, T. N. S.; SOUZA, S. A.M.; COSTA, F. R. Meiose e viabilidade polínica de acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1746–1751, 2010.
- MELO, L. F.; GOMES, R. L. F.; SILVA, V. B.; MONTEIRO, E. R.; LOPES, A. C. A.; PERON, A. P. Potencial ornamental de acessos de pimenta. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 2010-2015, 2014.
- MIRZAIE-NODOUSHAN, H.; DEGHANSHOAR, M.; MADDAH-AREFI, H.; ASADI-COROM, F. Karyotypic characteristics of several *Bromus* Species. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 8, p. 717–720, 2006.
- MONTEIRO, E. R.; BASTOS, E. M.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; NUNES, J. A. R. Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentas. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.288-283, fev. 2008.
- MOSCONI, E. A. Chromosome studies on *Capsicum* (Solanaceae) I. Karyotype analysis in *C. chacoense*. **Brittonia**, v. 42, n. 2, p. 147-154, 1990.
- MOSCONI, E. A.; LAMBROU, M.; HUNZIKER, A.T.; EHRENDORFER, F. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematic Evolution**, v. 186, p. 213-229, 1993.
- MOSCONI, E. A.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematic Evolution**, v. 202, p. 37-63. 1996.
- MOSCONI, E. A.; SCALDAFERRO, M. A.; GRABIELE, M.; CECCHINI, N. M.; SÁNCHEZ GARCIA, Y.; JARRET, R.; DAVIÑA, J. R.; DUCASSE, D. A.; BARBOZA, G. E.; EHRENDORFER, F. The evolution of chili peppers (*Capsicum* Solanaceae): a cytogenetic Perspective. **Acta Horticulturae**, v. 745, p. 137-170, 2007.
- MOSCONI, E. A.; SCALDAFERRO, M. A.; GRABIELE, M.; ROMERO, M. V.; DEBAT, H.; SEIJO, J. G.; ACOSTA, M. C.; DAVIÑA, J. R.; BARBOZA, G. E.; DUCASSE, D. A. Genomic characterization of the chilli peppers (*Capsicum*, Solanaceae) germplasm by classical and molecular cytogenetics. In: Physical Mapping Technologies for the identification and characterization of mutated genes to crop quality. **International Atomic Energy Agency – IAEA**, p. 97-104, 2011.
- NEITZKE, R. S.; BARBIERI, R. L.; RODRIGUES, W. F.; CORRÊA, I. V.; CARVALHO, F. I. F. de. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 47-53, 2010.
- NOWACZYK, P.; BANACH, M.; SIWICKA, J.; NOWACZYK, L. Capsaicinoid content of soft-flesh fruits of pepper *Capsicum frutescens* L. X *C. annuum* L. Interspecific hybrids – a short report. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.15/56, n.1, p.37–40, 2006.

PICKERSGRILL, B. Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, v. 100, p. 925–940. 2007.

POZZOBON, M. T.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. A meiotic study of the wild and semi-domesticated Brazilian species of genus *Capsicum* L. (Solanaceae). **Cytologia**, v. 71, n. 3, p. 275-287. 2006.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos para o agronegócio. In: NASS, L.L. (ed.) Recursos genéticos vegetais. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 281-305. 2007.

RANGANATHAN, P.; JAGTHEESWARI, D. Chromosome studies on Garden pepper. **International Journal of Research in Botany**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2013.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; NASS, L. L.; HENZ, G. P. **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. Brasília, DF. 21 ed. 156 p. 2014.

RIBEIRO, C. S. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Genética e melhoramento. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Pimentas *Capsicum*. Brasília: **Embrapa Hortaliças**. p.55–69, 2008.

ROHAMI, M.; MOHAMMADI, A.; KHOSROHAHLI, M.; AHMADI, H.; DARANDEH, N. Karyotype analysis of several ecotypes of *Capsicum annum* L. in Iran. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 3, p. 177-180, 2010.

SCALDAFERRO; M. A.; GABRIELE, M.; MOSCONE, E. A. Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chilli peppers (*Capsicum*, Solanaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 2, p. 693-709, 2012.

SOUZA, S. A. M. Caracterização citogenética, química e molecular em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. **Dissertação de Mestrado** – Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, RJ. 55p, 2008.

SIGNORINI, T.; RENESTO, E.; MARIA DE FÁTIMA, P S.; DAS N BESPALHOK, D.; ELIANE, R. Diversidade genética de espécies de *Capsicum* com base em dados de isozimas. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 534–539, 2013.

SILVA NETO, J. J. D.; RÊGO, E. R. D.; NASCIMENTO, M. F.; SILVA FILHO, V. A. L.; ALMEIDA NETO, J. X. D.; RÊGO, M. M. D. Variability in a base population of pepper (*Capsicum annum* L.). **Revista Ceres**, v. 61, n. 1, p. 84-89, 2014.

SOUSA, W. R. N. Caracterização cariotípica de acessos de pimentas (*Capsicum* sp). **Dissertação de Mestrado** (Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil, 45p. 2012.

SOUSA, W. R. N.; LOPES, A. C. A.; CARVALHO, R.; GOMES, R. L. F. Karyotypic characterization of *Capsicum* sp accessions. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 37, n. 2, no prelo. 2015.

- SOUZA, S. A. M.; MARTINS, K. C.; PEREIRA, T. N. S. Polimorfismo cromossômico em *Capsicum chinense* Jacq. **Ciência Rural**, v.41, n.10, p.1777-1783, 2011.
- TEODORO-PARDO, C. V. de.; GARCÍA-VELÁZQUEZ, A.; CORONA-TORRES, T. Polimorfismo cromossômico em *Capsicum annuum* L.(Solanaceae) em recolectas de Puebla, Morelos y Quartenário, México. **Agrociencia**, v. 41,n, 8, p. 873-881, 2007.
- TRAJANO, H. M. R. Produção de pimenta (*Capsicum* spp.) e aspectos socioeconômicos das hortas comunitárias de Teresina, Piauí. **Dissertação de Mestrado** (Desenvolvimento e Meio Ambiente) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 101p, 2009.
- VILLELA, J. C.; BARBIERI, R. L.; CASTRO, C. M.; NEITZKE, R. S.; VASCONCELOS, C. S.; CARBONARI, T.; PRIORI, D. Molecular characterization of landraces of peppers (*Capsicum baccatum*) with SSR markers. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 131-137, 2014.
- VYSKOT, B.; SIROKY, J.; HLADILOVA, R.; BELYAEV, N. D.; TUNER, B. M. Euchromatic domains in plant chromosomes as revealed by H4 histone acetylation and early DNA replication. **Genome**, v. 42, p. 343-350, 1999.
- WAKO, T.; FUKUDA, M.; FURUSHIMA-SHIMOGAWARA, R.; BELYAEV, N.; FUKUI, K. Cell cycle-dependent and lysine residue-specific dynamic changes of histone H4 acetylation in barley. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 645–653, 2002
- WOLF, K. W.; TURNER, B. M. The pattern of histone H4 acetylation on the X chromosome during spermatogenesis of the desert locust *Schistocerca gregaria*. **Genome**, v. 39, p. 854-865, 1996.
- ZENI, A. L.; BOSIO, F. O uso de plantas medicinais em uma comunidade rural de Mata Atlântica – Nova Rússia, SC. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 6, n. 1, p. 55-63, 2011.