



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2002

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 37

Análise de Seqüências de DNA Cloroplástico de Espécies do Gênero *Capsicum*

Gláucia Salles Cortopassi Buso
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral
Luciano de Bem Bianchetti
Márcio Elias Ferreira

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretaria-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1^a edição

1^a impressão (2002): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Análise de seqüências de DNA cloroplástico de espécies do gênero *Capsicum* / Gláucia Salles Cortopassi Buso... [et al.]. - Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

15 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 37)

1. *Capsicum* - DNA. 2. *Capsicum* - Filogenia. 3. *Capsicum* - Evolução. 4. Pimenta. I. Buso, Gláucia Salles Cortopassi. II. Título. III. Série.

572.8633 CDD - Ed. 21

© Embrapa 2002

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	13
Conclusão	18
Referências Bibliográficas	10

Análise de Seqüências de DNA Cloroplástico de Espécies do Gênero *Capsicum*

Gláucia Salles Cortopassi Buso ¹

Zilneide Pedrosa de Souza Amaral ²

Luciano de Bem Bianchetti ¹

Márcio Elias Ferreira ^{1,3}

Resumo

As pimentas e os pimentões (*Capsicum* spp.) são originários da América onde grande variabilidade genética natural é observada. Mais de 25 espécies de *Capsicum* já foram descritas no continente americano, em sua grande maioria espécies silvestres, muitas delas encontradas na Mata Atlântica e na região Amazônica. Cinco espécies são domesticadas e largamente utilizadas como alimento e condimento no mundo inteiro (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*). Outras 10 espécies são ainda semi-domesticadas e pouco utilizadas comercialmente.

O conhecimento das relações filogenéticas das espécies domesticadas e silvestres ainda é limitado. Este conhecimento é fundamental para a organização, caracterização e conservação do germoplasma e, principalmente, para o uso do recurso genético existente em cruzamentos viáveis nos programas de melhoramento. Recentes expedições de coleta no sudeste brasileiro possibilitaram a descoberta de populações naturais de pimentas. Os descritores botânicos estudados até o momento indicam que estas populações possivelmente representem novas espécies encontradas em resquícios de Mata Atlântica. Uma amostra de 54 acessos de pimentas silvestres e semidomesticadas e de acessos de pimenta e pimentão cultivados foi estudada

¹ Engº. Agrº., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Assistente de Operações I, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Universidade Católica de Brasília – Brasília, DF

em regiões polimórficas do genoma do cloroplasto visando estabelecer as relações filogenéticas entre os acessos. Amostras de DNA de espécies evolucionariamente mais distantes de *Capsicum* (*Nicotiana tabacum*, *Physalis* sp, *Lycopersicon esculentum* e *Atropa belladonna*) foram utilizadas como controle (“outgroups”). O estudo foi baseado na hipótese do “relógio molecular” através da avaliação de polimorfismo observado em regiões específicas do DNA cloroplástico (cpDNA) pela técnica de CAPS – (“cleaved amplified polymorphic sequence”). A análise fenética dos polimorfismos de cpDNA indicou inicialmente uma divisão dos acessos analisados em dois grupos principais, um correspondente aos acessos do gênero *Capsicum* e outro com os representantes do grupo controle (“outgroup”), confirmando a relação monofilética entre as espécies de *Capsicum*. O grupo do gênero *Capsicum*, por sua vez, foi subdividido em dois subgrupos, um contendo as espécies cultivadas e semi-domesticadas de *Capsicum* e outro com as espécies silvestres do gênero. No primeiro subgrupo os acessos de *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* formaram um agrupamento enquanto os acessos de *C. baccatum* foram agrupados em divisão independente. O segundo subgrupo de *Capsicum* dividiu-se em dois agrupamentos, um contendo as espécies silvestres recentemente coletadas na Mata Atlântica e outro contendo espécies silvestres classificadas em estudos anteriores: *C. villosum*, *C. bufforum*, *C. dusenii* e *C. campilopodium*. Um dos novos acessos da Mata Atlântica (sp6), no entanto, agrupou com acesso de *C. bufforum*. Dois dos novos acessos coletados (sp2 e sp3) apresentam haplótipo de cpDNA bastante similar. Os dados corroboram evidências botânicas de que alguns dos novos acessos de pimenta recentemente coletados na Mata Atlântica representam novas espécies do gênero.

Termos para indexação:
pimenta, CAPS, evolução, filogenia, cpDNA

DNA Chloroplastic Sequences Analysis of *Capsicum* Genus Species

Abstract

Peppers are originated in America where great natural genetic variability is observed. More than 25 *Capsicum* species were already described in the American continent, in their great majority wild species, many of them met in the Atlantic forest and Amazon. Five species are domesticated and largely utilized as food and condiment in the world (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*). Other 10 species are yet semi-domesticated and less commercially utilized. The knowledge of phylogenetic relationship of domesticated and wild species is still limited. This knowledge is fundamental for germplasm organization, characterization and conservation and, mainly, for the utilization of existent genetic resources in viable crossings in breeding programs. Recent collection expeditions in Brazilian southeast turned possible the discovery of pepper natural populations. The botanic descriptors studied until now indicated that these populations possibly represent new species met in Atlantic forest remainings. A sample of 54 accessions of wild, semidomesticated and cultivated peppers and sweet pepper were studied in polymorphic regions of chloroplast genome to establish phylogenetic relations among accessions. DNA samples of *Capsicum* evolutionary distant species (*Nicotiana tabacum*, *Physalis* sp, *Lycopersicon esculentum* and *Atropa belladonna*) were used as outgroups. The study was based in the molecular clock hypothesis through the evaluation of observed polymorphism in chloroplastic DNA specific regions by CAPS – (“cleaved amplified polymorphic sequence”). The phenetic analysis of cpDNA

polymorphisms indicated, initially, a division of analyzed accessions in two main groups, one corresponding to accessions of *Capsicum* genus and the other to outgroup species confirming the monophyletic relation among *Capsicum* species. The *Capsicum* genus group, was subdivided in two subgroups, one containing the cultivated and semi-domesticated *Capsicum* species and another one with the wild species. In the first subgroup the *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* accessions grouped together while *C. baccatum* accessions were grouped in an independent division. The second *Capsicum* subgroup was divided in two groupings, one containing the wild species recently collected in the Atlantic forest and other containing wild species classified in other studies: *C. villosum*, *C. bufferum*, *C. dusenii* e *C. campilopodium*. One of the Atlantic forest accessions (sp6), however, grouped with *C. bufferum* accession. Two of the recently collected accessions (sp2 e sp3) presented very similar cpDNA haplotype. The data corroborated botanic evidences that some of the new accessions recently collected in the Atlantic forest represent new species of the genus.

Index terms:

pepper, CAPS, evolution, phylogeny, cpDNA

Introdução

Capsicum é um gênero da família Solanaceae, é uma hortícola de valor crescente e o condimento de maior importância no mundo (Prince et al., 1995).

As pimentas e os pimentões (*Capsicum spp.*) são originários da América onde grande variabilidade genética natural é observada. A origem do gênero, no entanto, é controversa: alguns identificam como centro primário de diversidade o México/América Central com centros secundários no Brasil, enquanto outros propõem o centro de origem no Brasil e Bolívia, com dispersão posterior para os Andes e América Central (McLeod et al., 1983). Mais de 25 espécies de *Capsicum* já foram descritas no continente americano, em sua grande maioria espécies silvestres, muitas delas encontradas na Mata Atlântica e na região Amazônica. Cinco espécies são domesticadas e largamente utilizadas como alimento e condimento no mundo inteiro (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*). Outras 10 espécies são ainda semi-domesticadas e pouco utilizadas comercialmente. O conhecimento das relações filogenéticas das espécies domesticadas e silvestres ainda é limitado. Este conhecimento é fundamental para a organização, caracterização e conservação do germoplasma e, principalmente, para o uso do recurso genético existente em cruzamentos viáveis nos programas de melhoramento. Recentes expedições de coleta no sudeste brasileiro possibilitaram a descoberta de populações naturais de pimentas. Os descritores botânicos estudados até o momento indicam que estas populações possivelmente representem novas espécies encontradas em resquícios de Mata Atlântica.

A avaliação molecular é uma forma eficiente de se estudar a partição da variabilidade genética entre as espécies cultivadas e seus parentes silvestres, esclarecendo suas relações filogenéticas provendo estratégias racionais para o melhoramento, coleta de germoplasma, conservação e utilização de recursos genéticos.

Estudos recentes sobre a evolução do genoma do cloroplasto têm revelado um alto grau de conservação em tamanho, estrutura, conteúdo gênico e ordem linear dos genes entre espécies aparentadas. Este modo conservativo de evolução do cpDNA sugere que qualquer mudança em estrutura, arranjo ou conteúdo do genoma pode ter implicações filogenéticas significativas.

O objetivo deste trabalho foi a análise de uma amostra de 54 acessos de pimentas silvestres e semidomesticadas e de acessos de pimenta e pimentão cultivados em regiões polimórficas do genoma do cloroplasto visando estabelecer as relações filogenéticas entre os acessos.

Material e Métodos

Uma amostra de 54 acessos de pimentas silvestres e semidomesticadas e de acessos de pimenta e pimentão cultivados foi utilizada neste estudo, inclusive acessos de *Capsicum* recentemente coletados na floresta Atlântica (Tabela 1). Parte destes acessos foram analisados morfológicamente no campo e tentativamente classificada ao nível de espécie. Adicionalmente foram incluídas amostras de DNA de espécies evolucionariamente mais distantes de *Capsicum* (*Nicotiana tabacum*-TAB, *Physalis* sp-PHI, *Lycopersicon esculentum*-ESC e *Atropa belladonna*-BEL) que foram utilizadas como controle (“outgroups”).

Tabela 1. Acessos cultivados e silvestres de *Capsicum* analisados com marcadores de cloroplasto

Número	Nome do Acesso	Identificação Taxonómica
1	CNPH 26	<i>C. annuum</i>
2	CNPH 29	<i>C. annuum</i>
3	CNPH 59-B	<i>C. chinense</i>
4	CNPH 60	<i>C. chinense</i>
5	CNPH 62	<i>C. frutescens</i>
6	CNPH 63-B	<i>C. frutescens</i>
7	CNPH 37-A	<i>C. baccatum</i>
8	CNPH 161	<i>C. baccatum</i>
9	LBB 1553	<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i>
10	LBB 1555	<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i>
11	LBB 1538	<i>C. villosum</i> var. <i>vilosum</i>
12	LBB 1539	<i>C. villosum</i> var. <i>vilosum</i>
13	LBB 1543	<i>C. villosum</i> var. <i>vilosum</i>
14	LBB 1548	<i>C. villosum</i> var. <i>vilosum</i>
15	LBB 1557	<i>C. villosum</i> var. <i>vilosum</i>
16	LBB 1542	<i>C. dusenii</i>
17	LBB 1546	<i>C. dusenii</i>
18	LBB 1527	<i>C. dusenii</i>

Continua

Continuação da Tabela 1.

19	CNPH 1533	<i>C. flexuosum</i>
20	LBB 1552	<i>C. flexuosum</i>
21	LBB 1551	<i>C. buforum</i>
22	LBB 1550	<i>C. buforum</i>
23	LBB 1554	<i>C. buforum</i>
24	LBB 1562	<i>C. campylopodium</i>
25	LBB 1566	<i>C. campylopodium</i>
26	LBB 1520	C. sp 1
27	LBB 1521	C. sp 1
28	LBB 1523	C. sp 2
29	LBB 1526	C. sp 2
30	LBB 1525	C. sp 2
31	LBB 1535	C. sp 3
32	LBB 1536	C. sp 3
33	LBB 1540	C. sp 3
34	LBB 1544	C. sp 3
35	LBB 1545	C. sp 3
36	LBB 1561	C. sp 3
37	LBB 1563	C. sp 3
38	LBB 1537	C. sp 4
39	LBB 1547	C. sp 5
40	LBB 1556	C. sp 6
41	LBB 1559	C. sp 6
42	LBB 1568	C. sp 6
43	LBB 1564	C. sp 6
44	LBB 1567	C. sp 7
45	LBB 1558	C. sp 7
46	LBB 1565	C. sp 8
47	LBB 1569	C. sp 9
48	LBB 1549	C. sp ?
49		<i>N. tabacum</i>
50		<i>Phisalis</i> sp
51		<i>A. belladonna</i>
52		<i>L. esculentum</i>
53		<i>C. chacoense</i>
54		<i>C. chacoense</i>

Esta amostra foi estudada em regiões polimórficas do genoma do cloroplasto visando estabelecer as relações filogenéticas entre os acessos. O estudo foi baseado na avaliação de polimorfismo observado em regiões específicas do DNA cloroplástico (cpDNA) pela técnica de CAPS – (“cleaved amplified polymorphic sequence”). Foram utilizados primers universais para amplificar regiões específicas (Tabela 2). Estes primers foram desenhados para amplificar regiões não codificantes separadas por duas seqüências codificantes conservadas de DNA (Demasure et al., 1995 e Dumolin-Lapegue et al., 1997). Estas seqüências não codificantes foram então digeridas por várias endonucleases visando a detecção de polimorfismos informativos. O DNA genômico foi extraído conforme Ferreira e Grattapaglia (1998). As reações de amplificação continham 15 ng de DNA genômico, 10 mM Tris-HCl ph 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 ug/ul de BSA, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 uM de cada primer, 0,2 unidades de Taq polimerase. A reação de amplificação foi: um ciclo de 4 min à 94 °C, 30 ciclos de 45 seg. à 92 °C, 45 seg. à 56 °C, 3 min à 72 °C, num termociclador PTC-100 com “hot bonnet” (MJ Research Inc.).

Tabela 2. Seqüência dos primers universais de cpDNA usados neste estudo e o tamanho esperado do fragmento amplificado.

	Região Amplificada	Primers	Tamanho esperado do fragmento
cp1	<i>trnH</i> [t RNA-His (GUG)] to	5'-ACGGGAATTGAACCCGCGCA-3'	1.690 bp
	<i>trnK</i> [tRNA-Lys(UUU) exon1]	5'-CCGACTAGTTCCGGGTTCGA-3'	
cp2	<i>trnK</i> [tRNA-Lys(UUU) exon1] to	5'-GGGTTGCCCGGGACTCGAAC-3'	2.580 bp
	<i>trnK</i> [tRNA-Lys(UUU) exon2]	5'-CAACGGTAGAGTACTCGGTTTTA-3'	
cp4	<i>trnD</i> [tRNA-Asp(GUC)] to	5'-ACCAATTGAACTACAATCCC-3'	1.800 bp
	<i>trnT</i> [tRNA-Thr(GGU)]	5'-CTACCACTGAGTTAAAGGG-3'	
cp5	<i>psbC</i> [psII 44 kd protein] to	5'-GGTCGTGACCAAGAAACCAC-3'	1.680 bp
	<i>trnS</i> [tRNA-Ser(UGA)]	5'-GGTTCGAATCCCTCTCTC-3'	
cp6	<i>trnS</i> [tRNA-Ser(UGA)] to	5'-GAGAGAGAGGGATTGAAACC-3'	1.700 bp
	<i>trnM</i> [tRNA-fMet(CAU)]	5'-CATAACCTTGAGGTACCGGG-3'	
cp11	<i>trnQ</i>	5'-GGGACGGAAGGGATTGAAACC-3'	
	<i>trnR</i>	5'-ATTGCGTCCAATAGGATTGAA-3'	

Primers cp1, cp2, cp4, cp5 e cp6 foram desenhados por Demasure et al, 1995

Primer cp11 foi desenhado por Dumolin-Lapegue et al, 1997

Doze enzimas de restrição (Sau3A, Hae III, Hinf I, Msp I, Rsa I, Taq I, Dde I, Scrf I, Dra I, Hind III, Alu I e Bstu I) foram selecionadas entre 22 testadas por sua habilidade de corte e de identificação de fragmentos polimórficos.

Os produtos de amplificação e corte foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3,0%, corados com brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta. As fotografias foram tiradas em diferentes momentos para certificação de que todos os fragmentos resultantes do corte com endonuclease fossem detectados. O tamanho dos fragmentos foi estimado através do software SEQAID II, versão 3, (Rhoads and Roufa 1989).

Análise fenética – Para gerar as matrizes de similaridade os dados foram submetidos ao algoritmo de Jaccard e as matrizes foram utilizadas no agrupamento dos acessos via UPGMA (“unweighted pair-group method”) (Sneath and Sokal 1973). O dendrograma foi produzido no programa NTSYS-pc 2.0 (Rolph, 1989).

Resultados e Discussão

A análise fenética dos polimorfismos de cpDNA (Fig. 1) indicou inicialmente uma divisão dos acessos analisados em dois grupos principais, um correspondente aos acessos do gênero *Capsicum* e outro com os representantes do grupo controle (“outgroup”), confirmando a relação monofilética entre as espécies de *Capsicum* (Fig. 2). A distribuição natural das espécies do gênero *Capsicum* restringe-se a duas regiões: (a) Zona andina (Argentina-Venezuela) até a América Central e (b) Zona litorânea brasileira. As espécies do primeiro grupo serão denominadas andinas e as do segundo, brasileiras. O conhecimento mais difundido do gênero restringe-se, quase que exclusivamente, às espécies andinas. Quanto às brasileiras, o conhecimento se encontra em estádio muito rudimentar. Corroborando a distribuição geográfica, a distinção em dois grupos (espécies andinas x brasileiras) é justificada porque as espécies silvestres brasileiras do gênero, apresentam padrões morfológicos e ecológicos distintos das andinas (Bianchetti, 1996).

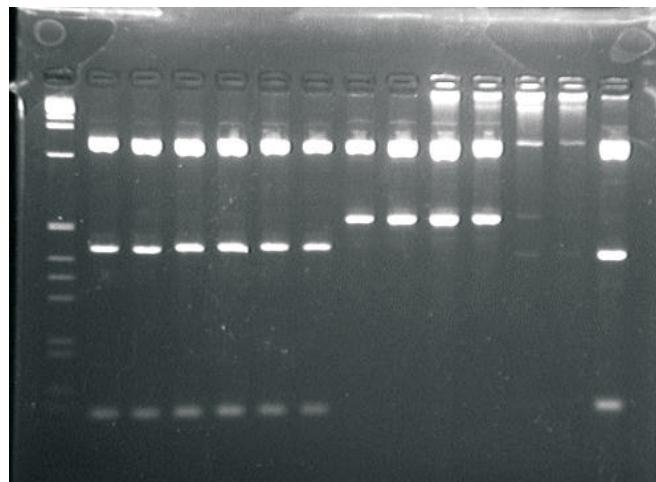


Fig. 1. Gel de agarose 3,0% mostrando o resultado do corte do fragmento cp1 com a enzima Taq I.. A primeira coluna é padrão 1Kb.

Entretanto, mesmo considerando-se as contribuições ao conhecimento atual, o gênero *Capsicum* demanda estudos básicos, principalmente quanto à taxonomia. Questões primárias, relativas à delimitação do gênero ainda não foram satisfatoriamente respondidas porque o gênero nunca foi avaliado em toda a sua extensão, ou seja, nunca foi realizado um estudo envolvendo todas as espécies silvestres, semidomesticadas e domesticadas onde questões morfológicas e genéticas são contempladas. Por esse motivo e, principalmente pelo quase total desconhecimento das espécies brasileiras, nota-se que os limites genéricos são ora reduzidos, ora ampliados. Por exemplo, quando nos referimos ao número cromossômico básico, Hunziker (1979), afirma que esse número, para a tribo Solaneae, a qual pertence o gênero *Capsicum*, é $x = 12$. No entanto, várias espécies como *C. ciliatum* (Pickersgill, 1977), uma espécie não identificada do sudeste brasileiro (Pickersgill, 1977), *C. campylopodium* e *C. mirabile* (Moscone et al., 1993) e *C. lanceolatum* (Tong & Bosland, 1997), são citologicamente atípicas tendo o número básico $x = 13$. “*Embora Pickersgill (1977, 1991) hesite sobre a inclusão destes táxons no gênero em questão, estudos taxonômicos extensivos realizados por Hunziker demonstram ser correta a permanência destas espécies em Capsicum*” (Moscone et al., 1993, p.225). Eshbaugh (1983) hesita, como Pickersgill, sobre a manutenção destes *taxa* ($x = 13$) no gênero. Questões sobre a morfologia e pungência dos frutos também são questionadas. Por exemplo, Morton (1938) propôs que as espécies de

Capsicum devam ter, entre outras características, frutos brilhantes e pungentes. Heiser e Smith (1958), concordam com Morton acreditando que as espécies não possuidoras destas características deveriam ser excluídas do gênero. Mais tarde, Lippert et al. (1966) demonstraram que o caracter pungência é controlado por um único gene e que poderia ser facilmente alterado. A prova disso é que podemos observar vários exemplares de *Capsicum* domesticados e silvestres como *C. ciliatum*, *C. chacoense* (Eshbaugh, 1980), *C. dusenii* (Hunziker, 1971) e *C. parvifolium* (Filippa e Bernardello, 1992) sem pungência alguma.

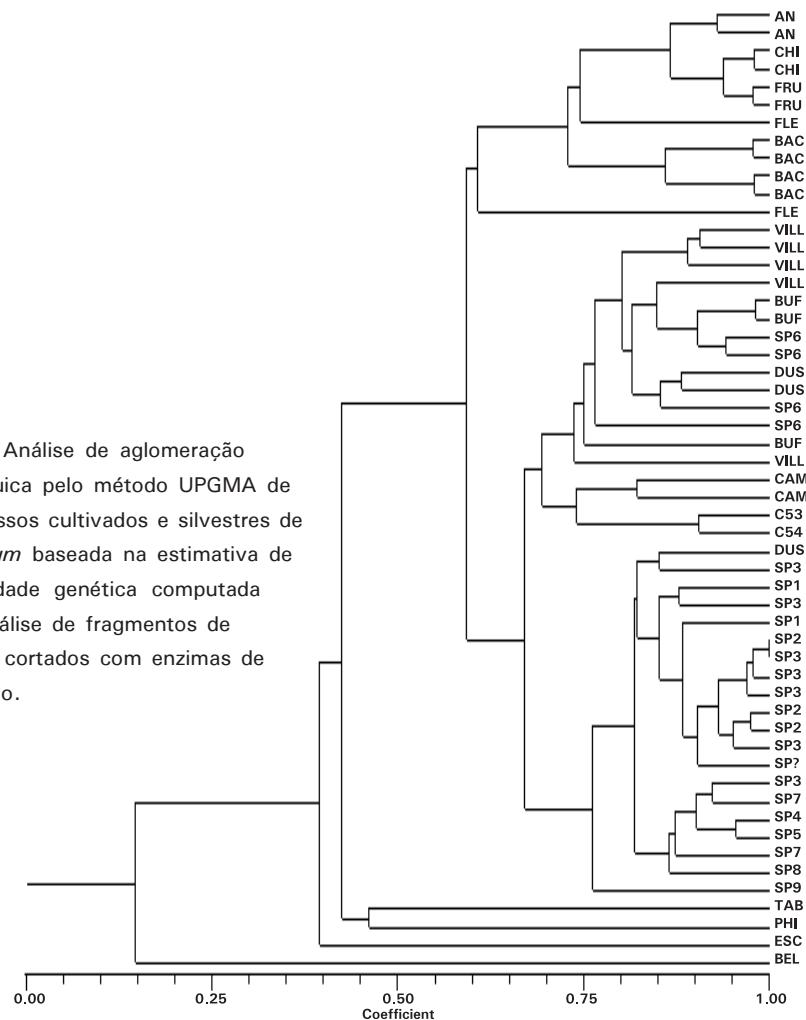


Fig. 2. Análise de aglomeração hierárquica pelo método UPGMA de 54 acessos cultivados e silvestres de *Capsicum* baseada na estimativa de similaridade genética computada pela análise de fragmentos de cpDNA cortados com enzimas de restrição.

Essa breve introdução teve por objetivo corroborar a idéia da não exclusão do gênero daquelas espécies com número cromossômico $x = 13$ e sem pungência (características encontradas em vários exemplares silvestres brasileiros analisados). Isso pode ser visualizado no dendrograma (Fig. 2) onde forma-se um agrupamento distinto, contendo todos os acessos de *Capsicum* analisados, em detrimento dos arranjos envolvendo os grupos externos (*Nicotiana tabacum* TAB, *Physalis* sp. PHI, *Lycopersicon esculentum* ESC e *Atropa belladonna* BEL).

No agrupamento dos acessos domesticados, os subgrupos formados corroboram os resultados encontrados na literatura (Pickersgill et al. 1979; Eshbaugh, 1983), onde os componentes do grupo *C. annuunn* (AN 1 e 2), *C. chinense* (CHI 3 e 4) e *C. frutescens* (FRU 5 e 6) mostram-se geneticamente próximos entre si e distintos do subgrupo de *C. baccatum* (BAC 7, 8, 9 e 10). Para o subgrupo *C. baccatum* os presentes resultados também confirmam aqueles registrados em literatura (Eshbaugh, 1983), onde os acessos semidomesticados (*C. baccatum* var. *praetermissum* BAC 9 e 10) mostram-se geneticamente próximos dos acessos domesticados (*C. baccatum* var. *pendulum* BAC 7 e 8). Os resultados corroboram, também, análises eletroforéticas de Jensen et al (1979) e McLeod et al (1983) com *C. baccatum* var *baccatum* e *C. baccatum* var. *praetermissum*, que demonstram serem geneticamente distintos. No presente trabalho estas espécies formaram um grupo mas as diferenças do cloroplasto subdividiram-nas em 2 subgrupos.

Curiosamente, *C. flexuosum*, uma espécie silvestre com número básico cromossômico também $x = 12$ (Moscone, 1992), aparece dentro do grupo de acessos domesticados. Isso indica que, das espécies silvestres analisadas, *C. flexuosum* é aquela que apresenta-se geneticamente mais próxima das domesticadas e, sua importância para o “pre-breeding” ou para estudos evolutivos no gênero, deve ser considerada.

Partindo-se do pressuposto que espécies foram domesticadas a partir de ancestrais silvestres e, que muitos centros de diversidade para as domesticadas encontram-se na zona andina, esperar-se-ia uma maior proximidade genética entre as espécies silvestres andinas e as domesticadas. Mesmo ao considerarmos que apenas dois acessos silvestres andinos foram analisados (*C. chacoense* C53 e C54), *C. flexuosum* mostra-se mais próximo das domesticadas que *C. chacoense*, que é andino. *C. flexuosum* também mostra algumas características que ora se enquadram no conjunto de espécies silvestres

brasileiras e ora no conjunto das andinas, por exemplo: a) quanto à distribuição geográfica - considerando-se os dois agrupamentos de espécies silvestres (andinas x brasileiras), um distribuído exclusivamente a oeste e o outro a leste da América do sul, encontramos a distribuição de *C. flexuosum* exatamente na área de interseção das duas distribuições, atingindo a região sul brasileira, o nordeste da Argentina e Paraguai; b) quanto à morfologia dos frutos - todas as espécies silvestres exclusivamente brasileiras possuem frutos pendentes e de coloração amarelo-esverdeado, enquanto as andinas apresentam-nos eretos e de coloração vermelha; *C. flexuosum* apresenta frutos pendentes (característica das espécies brasileiras) e vermelhos (característica das espécies andinas).

A divisão entre acessos silvestres e domesticados poderia, a princípio, estar relacionada com o número cromossômico. No entanto, os acessos de *C. chacoense* (C53 e C54) que, comprovadamente, possuem $x = 12$ (Moscone, 1990, 1992 e Moscone et al. 1993) aparecem mais próximos dos acessos silvestres que dos domesticados. Ainda, os dois acessos de *C. chacoense* mostram-se mais próximos de *C. campylopodium* (CAM 24 e 25), uma espécie silvestre que possui $x = 13$ (Moscone et al., 1993) e que apresenta a exclusiva morfologia dos frutos comprimidos lateralmente.

O segundo subgrupo de *Capsicum*, que inclui as outras espécies silvestres brasileiras, dividiu-se em dois agrupamentos, um contendo as espécies silvestres recentemente coletadas na Mata Atlântica e outro contendo espécies silvestres classificadas em estudos anteriores: *C. villosum*, *C. buforum*, *C. dusenii* e *C. campylopodium*. Deve-se salientar que muitas dessas ainda não foram satisfatoriamente identificadas, em nível específico. Entretanto, baseando-nos em características morfológicas, foi possível que as agrupassem (diferentes acessos) em unidades diferentes (SP1, SP2, SP3,...). Assim, esse agrupamento apresenta-se dividido. O primeiro subgrupo inclui todos os acessos de *C. villosum* (VILL 11, 12, 13, 14 e 15); de *C. buforum* (BUF 21, 22 e 23); de SP6 (40, 41, 42 e 43); de *C. dusenii* (DUS 16 e 17), exceto o acesso DUS 18; de *C. campylopodium* (CAM 24 e 25) e *C. chacoense* (C53 e 54). O outro subgrupo inclui todos os acessos de SP1 (26 e 27); de SP2 (28, 29 e 30); de SP3 (31, 32, 33, 34, 35, 36, 37); de SP4 (38); de SP5 (39); de SP7 (44 e 45); de SP8 (46) e SP9 (47). Estes dados provavelmente indicam a proximidade maternal dos acessos recém coletados, com exceção da sp6 que tem cloroplasto similar ao grupo de espécies classificadas anteriormente.

Em apenas dois casos foram coletadas amostras de diferentes populações restritas a uma mesma área: *C. villosum* (VILL 11, 12 e 13) e SP3 (31, 32 e 33), todas da Estação Biológica de Boracéia-SP. Para esses casos, verificou-se que, mesmo para cpDNA, diferentes acessos, de uma mesma espécie, apresentam variabilidade genética entre indivíduos de populações de uma mesma área, sendo que a variabilidade torna-se mais acentuada quando comparamos indivíduos pertencentes à populações de áreas diferentes. Assim, os acessos de *C. villosum* (VILL 11, 12 e 13) mostram-se próximos entre si e distantes do acesso VILL 15, do Parque Nacional do Itatiaia-RJ. Do mesmo modo, os acessos de SP3 (31, 32 e 33) mostram-se próximos entre si e distantes dos acessos SP3 (34, 36 e 37) respectivamente de Natividade-SP, Parque Nacional da Tijuca-RJ e Roscio-RJ.

De modo geral, mesmo em nível de cloroplasto, indivíduos pertencentes à mesma espécie apresentam uma considerável variabilidade genética. Pode-se notar, também, na Fig. 2, que essa variabilidade é mais acentuada entre indivíduos silvestres que em indivíduos domesticados. Em apenas um caso, SP2 (28) e SP3 (32), notou-se uma grande similaridade entre indivíduos pertencentes à espécies diferentes. No entanto, não descartamos a possibilidade de erro, seja na identificação dos acessos ou por falha laboratorial.

Como já foi salientado, muitos acessos ainda não foram satisfatoriamente identificados, em nível específico. No entanto, alguns são, incontestavelmente, novos para a ciência, SP4 (38), SP7 (44 e 45) e SP8 (46), por apresentarem características morfológicas distintas dos demais. Curiosamente, esses mesmos acessos aparecem agrupados.

Conclusão

- Não exclusão do gênero daquelas espécies com número cromossômico $x = 13$ e sem pungência (características encontradas em vários exemplares silvestres brasileiros analisados).
- Os acessos não foram subdivididos conforme o número de cromossomos ($x = 12$ ou $x = 13$).
- Para alguns casos, verificou-se que, mesmo para cpDNA, diferentes acessos, de uma mesma espécie, apresentam variabilidade genética entre indivíduos de populações de uma mesma área, sendo que a variabilidade torna-se mais acentuada quando comparamos indivíduos pertencentes à populações de áreas diferentes.

Referências Bibliográficas

- BIANCHETTI, L. B. **Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de Capsicum (Solanaceae) ocorrentes no Brasil.** 174 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 1996.
- DEMESURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R. J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molec. Ecol.** 4: 129-131, 1995.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S.; PEMONGE, M. H.; PETIT, R. J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. **Molec. Ecol.**, v. 6, p. 393-397, 1997.
- ESHBAUGH, W. H. The Taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). **Phytologia**, v. 47, n. 3, p. 153-166, 1980.
- ESHBAUGH, W. H. The genus *Capsicum* (Solanaceae) in Africa. **Bothalia**, v. 14, n. 3-4, p. 845-848, 1883.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FILIPPA, E. M.; BERNARDELLO, L. M. Estructura y desarrollo de fruto y semilla en especies de *Athenaea*, *Aureliana* y *Capsicum* (Solanaceae, Solanaceae). **Darwiniana**, v. 31, n. 1-4, p. 137-150, 1992.
- HEISER, C. B.; SMITH, P. G. New species of *Capsicum* from south America. **Brittonia**, v. 10, n. 4, p. 194-201, 1958.
- HUNZIKER, A. T. Estudios sobre Solanaceae. VII. Contribucion al conocimiento de *Capsicum* y generos afines (*Witheringia*, *Acnistus*, *Athenaea*, etc.). Tercera Parte. **Kurtziana**, v. 6, p. 241-259. 1971.
- HUNZIKER, A. T. South American Solanaceae: a sinoptic survey. In: HAWKES, J. G.; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (Ed.). **The Biology and Taxonomy of**

the Solanaceae. London: Academic Press, 1979. p. 49-86. Linnean Society Symposium Series, 7).

JENSEN, R. J.; McLEOD, M. J.; ESHAUGH, W. H.; GUTTMAN, S. I. Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (Solanaceae). **TAXON**, v. 28, n. 4, p. 315-327.

LIPPERT, L. F.; SMITH, P. G.; BERGH, B. O. Cytogenetics of the vegetable crops. Gardens peppers, *Capsicum* sp. **Botanical Review**, v. 32, n. 1, p. 24-55, 1966.

MCLEOD, M. J.; GUTTMAN, S. I.; ESHBAUGH, W. H. Peppers (*Capsicum*). In: S. D. TANKSLEY; T. J. ORTON (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**, Part B. Amsterdam Elsevier Science Publishers, 1983.

MORTON, C. V. *Capsicum*. **Flora of Costa Rica** (Standley). v. 18, pt. 3, p. 1038-1045, 1938.

MOSCONE, E. A. Chromosome studies on *Capsicum* (Solanaceae) I. Karyotype analysis in *C. chacoëns*. **Brittonia** v. 42, p. 147-154, 1990.

MOSCONE, E. A. Estudios de cromosomas meioticos en Solanaceae de Argentina. **Darwiniana**, v. 31, n.1-4, p. 261-297, 1992.

MOSCONE, E. A.; LAMBOURS, M.; HUNZIKER, A. T.; EHRENDORFER, F. Giensa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 186, f. 213-229. 1993.

PICKERSGILL, B. Chromosomes and evolution in *Capsicum*. p.27-37. In: POCHARD, E. (Ed.). **Capsicum 77**. Mont Favet-Avignon, France; Compte. Rendues 3emé Congrès Eucarpia Piment, 1977.

PICKERSGILL, B.; HEISER, C. B.; McNEILL, J. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: HAWKES, J. G.; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (Ed.). **The Biology and Taxonomy of the Solanaceae**. London: Academic Press, 1979. p. 49-86. Linnean Society Symposium Series, 7).

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

RHOADS, D. D.; ROUFA, D. J. SEQAIID II. Molecular genetics laboratory. Manhattan, KS: Kansas... Center for basic cancer research. Kansas State University, 1989.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: WH Freeman, 1973.

TONG, N.; BOSLAND, P. W. Meiotic chromosome study of *Capsicum lanceolatum*. Another 13 chromosome species. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 16, p. 42-43, 1997.