

Caracterização da variabilidade genética de populações locais de pimenta dedo-de-moça, utilizando marcadores RAPD





Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1981-5980

Dezembro, 2008

versão
ON LINE

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 80

Caracterização da
variabilidade genética de
populações locais de pimenta
dedo-de-moça, utilizando
marcadores RAPD

Daniela Lopes Leite
Denilson Anthonisen
Rosa Lia Barbieri

Pelotas, RS
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
Endereço: BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 - 3275-8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro
Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia
Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Verneti Azambuja, Luís Antônio Suita de Castro
Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Revisor de texto: Sadi Macedo Sapper
Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos
Editoração eletrônica: Oscar Castro
Arte da capa: Miguel Ângelo (estagiário)

1ª edição

1ª impressão (2008): 50 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).

Leite, Daniela Lopes.

Caracterização da variabilidade genética de populações locais de pimenta dedo-de-moça, utilizando marcadores RPD / Daniela Lopes Leite, Denilson Anthonisen, Rosa Lia Barbieri. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

21 p. -- (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 80).

ISSN 1678-2518

Pimenta – *Capsicum bacctum* – Germoplasma – Variabilidade genética. I. Anthonisen, Denilson. II. Barbieri, Rosa Lia. III. Título. IV. Série.

CDD 583.952

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	13
Conclusões	17
Referências	17

Caracterização da variabilidade genética de populações locais de pimenta dedo-de-moça, utilizando marcadores RAPD

Daniela Lopes Leite¹
Denilson Anthonisen²
Rosa Lia Barbieri³

Resumo

A cultura da pimenta ocorre em quase todas as regiões brasileiras. É um dos melhores exemplos de agricultura familiar e da integração de pequenos produtores e da indústria. O mercado está exigindo novas cultivares com melhor qualidade e maior produtividade e resistência às doenças. A Embrapa Clima Temperado, em 2002, organizou o primeiro banco ativo de germoplasma (BAG) de *Capsicum* da região Sul do Brasil, no qual são realizados trabalhos de resgate, conservação e caracterização de recursos genéticos. Este trabalho avaliou a variabilidade genética de nove populações presentes no BAG, pela técnica de RAPD, para prospectar genótipos a serem utilizados no desenvolvimento de novas cultivares. Utilizaram-se quatro *primers* e 81 plantas, obtendo-se 37 (77,1%) bandas

¹ Eng. Agrôn. , Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, BR 392, km 78, Cx. Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS. (daniela@cpact.embrapa.br)

² Químico, M.Sc., Analista da Embrapa Clima Temperado, BR 392, km 78, Cx. Postal 403, 96001-970 Pelotas, RS. (denilson@cpact.embrapa.br)

³ Bióloga, Dra., Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, BR 392, km 78, Cx. Postal 403, 96001-970 Pelotas, RS. (barbieri@cpact.embrapa.br)

polimórficas. O número de fragmentos por *primer* variou de 6 (*primer* OPAB-8) a 16 (*primer* OPA-2). A análise de agrupamento permitiu a separação das populações em 13 grupos, e em geral, cada população pertencendo a um grupo, com uma similaridade média de 65%. Considerando que cada produtor tem seu próprio critério de seleção de pimentas, resultando em tipos diferentes, o mesmo pode ser observado ao nível molecular, com as plantas de cada agricultor formando grupos distintos. As populações apresentaram ampla variabilidade genética, demonstrando potencial de utilização em programas de melhoramento genético.

Termos para indexação: *Capsicum baccatum*, germoplasma, variabilidade genética

Characterization of the Genetic Variability of Landraces of “Dedo-de-Moça” Pepper, Using RAPD Markers

Abstract

The pepper culture occurs in almost all-Brazilian regions. It is one of the best examples of familiar agriculture and of the integration of small growers and industry. The market is demanding for new cultivars with better quality, productivity and disease resistance. Embrapa Clima Temperado, in 2002, organized the first active germplasm bank (BAG) of Capsicum in Southern Brazil, in which are carried out rescue, conservation and characterization of genetic resources. This work evaluated the genetic variability of nine populations present in the BAG through RAPD analyses as a source of genotypes to be used in the development of new cultivars. Four primers and 81 plants were utilized, obtaining 37 (77,1%) polymorphic bands. The number of fragments per primer varied from 6 (primer OPAB-8) to 16 (primer OPA-2). The grouping analysis allowed the separation of populations in 13 groups, with in general, each population belonging to one group, with an average similarity of 65%. Considering that each farmer possesses his own selection criteria of peppers, resulting in different types, the same could be observed at the molecular level, with the plants of each grower forming distinct groups. The populations presented a broad genetic divergence demonstrating potential of utilization in genetic breeding programs.

Index terms: Capsicum baccatum, germplasm, genetic variability

Introdução

O Brasil é um importante centro de diversidade genética do gênero *Capsicum*, possuindo uma ampla variabilidade de pimentas e pimentões. A cultura da pimenta ocorre em quase todas as regiões, sendo os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Ceará e Rio Grande do Sul, os principais produtores. O seu cultivo é realizado por pequenos, médios e grandes produtores individuais ou integrados a agroindústrias. É uma atividade de grande importância sócioeconômica, por constituir-se em uma opção de integração do pequeno agricultor com a agroindústria, pois as pimentas, além de consumidas frescas, podem ser processadas e utilizadas em diversas linhas de produtos na indústria de alimentos. A área anual cultivada no Brasil é de aproximadamente cinco mil hectares, com produção de 75 mil toneladas e com uma produtividade média variando de 10 t/ha a 30 t/ha dependendo do tipo de pimenta cultivada (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2008; WAGNER, 2003).

No Rio Grande do Sul, o município de Turuçu é conhecido como a Capital Nacional de Pimenta. Nesta área, o cultivo vem sendo praticado por agricultores de base familiar, há mais de um século, utilizando populações locais de sementes obtidas em suas próprias lavouras (MADAIL et al., 2005). Existe uma variabilidade genética entre e dentro das populações, e é comum a ocorrência de plantas com diferentes níveis de resistência às doenças e com frutos de diferentes cores e formas na mesma área produtora (NEITZKE et al., 2005).

A Embrapa Clima Temperado iniciou, em 2002, uma série de coletas de pimentas, na maioria de cultivares crioulas do Sul

do Brasil e organizou o primeiro banco ativo de germoplasma (BAG) de *Capsicum* da região Sul do Brasil, onde são realizadas atividades de resgate, conservação e caracterização de recursos genéticos (BARBIERI, 2006).

A caracterização de germoplasma se constitui em importante elo de ligação entre a conservação e a utilização dos recursos genéticos. Trabalhos de caracterização morfológica dos acessos do BAG de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado foram conduzidos, com relação a características de planta (arquitetura, altura, hábito de crescimento, diâmetro da copa) e de frutos (formato, pungência, coloração) demonstrando grande variabilidade entre os acessos (BARBIERI et al., 2007).

Da mesma forma, Sudré et al. (2005) avaliando os acessos da coleção de germoplasma de *Capsicum* spp. da Universidade Estadual do Norte Fluminense, através de 11 descritores quantitativos relativos a planta, frutos e sementes observaram diferença significativa entre os acessos, para todos os descritores avaliados, com potencial de serem utilizados como genitores em cruzamentos para criação de progênie com alta heterose.

As técnicas moleculares de análise do DNA são ferramentas auxiliares aos descritores morfológicos convencionais, que permitem aos pesquisadores acessar a variabilidade genética dentro e entre espécies, tendo o potencial de auxiliar na identificação de novas fontes de variabilidade e de utilidade no desenvolvimento de novas cultivares de pimenta (PRINCE et al., 1995; RODRIGUEZ et al., 1999).

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

Guzmám et al. (2005), utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP, conseguiram realizar uma rápida e eficiente avaliação

da variabilidade genética presente em germoplasma de *Capsicum* de quintais residenciais e da coleção nacional *ex situ* da Guatemala.

A diversidade genética das várias espécies domesticadas de *Capsicum* tem sido muito pouco explorada. Esta diversidade representa uma oportunidade de utilização de germoplasma mais fácil e mais simples, comparada a outras estratégias de melhoramento, como por exemplo, por meio da transferência de genes por cruzamentos interespecíficos (PICKERSGILL, 1997).

Há uma demanda crescente por novas cultivares, com melhor qualidade, alta produtividade e resistência a doenças (BOSLAND e VOTAVA, 2000). As ações do BAG de *Capsicum* estão integradas às do programa de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado, que tem como principais objetivos: desenvolver novas cultivares que sejam produtivas, com resistência a antracnose, com frutos de cor vermelho intenso e aroma pronunciado, adequados para o mercado *in natura* e para a produção de pimenta desidratada tipo calabresa (BARBIERI, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar molecularmente, utilizando a análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), a variabilidade genética de populações de pimenta do tipo dedo-de-moça presentes no BAG de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, para prospectar genótipos a serem utilizados no desenvolvimento de novas cultivares, que sejam mais competitivas para o mercado.

Material e Métodos

Foram analisadas 81 plantas pertencentes a nove populações de pimenta tipo dedo-de-moça, cultivadas em pequenas propriedades da região sul do Rio Grande do Sul, as quais foram nomeadas segundo o nome do agricultor: Adão(P8) (8 plantas), Arlei(P62a) (13 plantas), Arlei(P62v) (13 plantas),

Everaldo(P7) (3 plantas), Ildo(P2) (5 plantas), Ivo(P1) (6 plantas), Neitzke (9 plantas), Orli (16 plantas) e Soni (8 plantas). As populações analisadas são na maioria do município de Turuçu, com exceção de ArleyP62a e ArleyP62v, que são do município de São Lourenço do Sul, e Neitzke, que é de Pelotas.

Todos os agricultores mantêm suas populações, produzindo as sementes que utilizam. Possuem critérios próprios de seleção para as características de plantas e dos frutos. Todas as populações analisadas estão amostradas no banco ativo de germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, sendo que com exceção da Arlei(P62a), que é de frutos amarelos, todas as demais são de frutos vermelhos.

As amostras utilizadas para as análises foram folhas jovens coletadas de plantas cultivadas nas propriedades. Cada amostra com 110 a 140 mg de tecido foliar, foi colocada em tubos tipo Eppendorf e armazenadas a -80°C até o momento das extrações de DNA.

Os procedimentos usados na extração de DNA e separação dos fragmentos amplificados por eletroforese foram os descritos por Ferreira e Grattapaglia (1998). A estimativa da concentração de DNA, em géis de agarose, foi realizada com base na comparação da intensidade das bandas com o DNA padrão lambda cortado com a enzima *HindIII*. Foi estabelecida a concentração final de DNA de $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

Foram testados 33 *primers* de RAPD da marca Operon Technologies, Inc., CA, dos quais quatro foram selecionados por serem polimórficos, reproduzíveis e pelo elevado número de marcadores.

As reações de amplificação de DNA, com um volume de 13 μL , seguiram o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998), contendo cada mistura de reação: Tris HCl pH 8,8 (10mM), MgCl_2 (2mM), dNTPs (0,2mM), BSA purificada (0,04%), *primer* (0,4 μM), taq polimerase (1U) e DNA genômico (10ng). As amplificações foram realizadas em um termociclador

(RoboCycler 96 Temperature Cycler – Stratagene) programado para 40 ciclos repetidos nas seguintes condições: 1 minuto a 92°C (desnaturação), um minuto a 35°C (anelamento) e dois minutos a 72°C (extensão). Após, foi efetuado um passo final de extensão de cinco minutos a 72°C.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel submerso de agarose a 1,2%, onde migraram sob diferença de potencial de 80 V por um período médio de três horas e trinta minutos. Foram corados com brometo de etídeo (5 µL de uma solução 10 mg.mL⁻¹ para cada gel de 100 mL), e fotografados sob luz ultravioleta (302 nm).

Os acessos foram genotipados através dos produtos visualizados em gel e uma matriz de presença/ausência de bandas foi utilizada nas análises de similaridade genética e agrupamento. Estas foram efetuadas por meio do programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers), versão 2.0 (ROHLF, 1992), utilizando o coeficiente de Jaccard e o método da média aritmética não ponderada.

Resultados e Discussão

Os quatro *primers* produziram 48 bandas, sendo 37 polimórficas, com um número médio de 12 bandas por *primer* e variando de seis (*primer* OPAB-8) até 16 (*primer* OPA-2) (Tabela 1). Adetula (2006) quando estudando a divergência genética de 40 acessos de *Capsicum* de coleções africanas de germoplasma, com marcadores RAPD e *primers* da Operon, produziu entre 7 e 14 bandas por *primer*, resultado semelhante ao do presente trabalho e obteve a separação dos acessos em quatro grupos com similaridade de 75%.

Tabela 1. Polimorfismo apresentado pelos primers selecionados na caracterização de populações locais de pimenta dedo-de-moça da região sul do Rio Grande do Sul através da técnica de RAPD. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2006.

Identificação	Primer	Marcadores		
	Seqüência de bases	Total n.	Polimórficos	
			n.	%
OPA-02	TGCCGAGCTG	16	13	81
OPAB-08	GTTACGGACC	6	2	33
OPAA-11	ACCCGACCTG	13	10	77
OPR-06	GTCTACGGCA	13	12	92
TOTAL		48	37	

Fonte: LEITE et al, 2006

A análise de agrupamento permitiu a separação das nove populações em 13 grupos, sendo que, em geral, cada população pertencendo a um grupo ou a grupos muito próximos, com uma similaridade média de 65%. Quatro populações [(Adão(P8), Everaldo(P7), Ildo(P2), e Soni)], segregaram-se totalmente em quatro grupos diferentes. Em outras quatro populações [Arlei(P61a), Ivo(P1), Neitzke e Orli], embora tenham sido gerados quatro grupos distintos, uma ou duas [Ivo(P1)] plantas de cada população agruparam-se em outro grupo. Somente a população Arlei(P62v) teve indivíduos presentes em quatro grupos distintos, onde três grupos contêm somente plantas desta população e um grupo também contém plantas de uma outra população [Arlei (P62a)]. Como Arlei(P62v) e Arlei(P62a) são respectivamente populações de pimenta vermelha e amarela oriundas do mesmo agricultor, esperava-se que fossem agrupadas (Figura 1). Considerando que cada agricultor possui seus próprios critérios de seleção de pimenta, resultando em diferentes tipos, o mesmo pode ser observado molecularmente, com o as plantas de cada agricultor formando grupos distintos.

A importância do cultivo das cultivares crioulas de pimenta na manutenção da variabilidade de recursos genéticos de pimenta foi estudada por Portis et al., (2006), quando avaliaram 19 populações locais de pimenta na Itália. Eles demonstraram com análises moleculares e morfológicas de frutos, que populações de mesma origem, apresentam divergência genética, provavelmente devido às condições edafoclimáticas e padrões de seleção característicos de cada propriedade.

Em um outro estudo, utilizando marcadores moleculares RAPD e AFLP, Lanteri et al., (2003), avaliaram a variabilidade genética dentro e entre cinco populações da cultivar crioula de pimenta denominada Cuneo, provenientes do noroeste da Itália. À semelhança deste trabalho, observaram variabilidade genética tanto entre como dentro das populações. Em uma das populações, a variabilidade genética era muito baixa e presumiram este fato era atribuído à amostragem na produção de sementes.

Os resultados obtidos neste trabalho, com o agrupamento dos indivíduos conforme sua população de origem, também foram observados por Buso et al. (2001), quando estudando a relação genética entre acessos de pimenta de diferentes espécies do Banco de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças, pela técnica de RAPD. Aqueles autores observaram que os acessos de *Capsicum baccatum* formaram subgrupos aparentemente correlacionados com sua origem geográfica.

Conclusões

As populações locais de pimenta de agricultores de base familiar da região sul do Rio Grande do Sul apresentam variabilidade genética e têm potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de novas cultivares em programas de melhoramento genético.

A técnica de RAPD é eficiente na avaliação da variabilidade genética de genótipos de pimenta, assim como possibilita a separação de indivíduos em grupos distintos, de acordo com a sua população de origem.

Referências

ADETULA, O. A. Genetic diversity of *Capsicum* using Random Amplified Polymorphic DNAs. *African Journal of Biotechnology*, Abraka, v. 5, n. 2, p. 120-122, 2006.

BARBIERI, R. L. Pesquisa com *Capsicum* na Embrapa Clima Temperado. In: ENCONTRO NACIONAL DO AGRONEGÓCIO PIMENTAS (*Capsicum* spp.), 2. ; MOSTRA NACIONAL DE PIMENTAS E PRODUTOS DERIVADOS, 2., 2006, Brasília, Anais... Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 3 p. 1 CD-ROM.

BARBIERI, R. L. ; HEIDEN, G. ; NEITZKE, R. S. ; CHOER, E. ; LEITE, D. L. ; GARRASTAZÚ, M. C. . *Capsicum* gene bank of Southern Brazil. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 745, p. 319-322, 2007.

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

BUSO, G. S. C.; LOURENÇO, R. T.; BIANCHETTI, L. B.; LINS, T. C. L.; POZZOBON, M.T.; AMARAL, Z.P.S.; FERREIRA, M.E. Espécies silvestres do gênero *Capsicum* coletadas na Mata Atlântica Brasileira e sua relação genética com espécies cultivadas de pimenta: uma primeira abordagem genética utilizando

marcadores moleculares. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 22 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 7).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

GUZMÁN, F. A.; AYALA, H.; AZURDIA, C.; DUQUE, M. C.; VICENTE, M. C. de. AFLP assessment of genetic diversity of *Capsicum* genetic resources in Guatemala: home gardens as an option for conservation. *Crop Science*, Madison, v. 45, p. 363-370, 2005

LANTERI, S.; ACQUADRO, A.; QUAGLIOTTI, L.; PORTIS, E. RAPD and AFLP assesment of genetic variation in a landrace of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in North-West Italy. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Dordrecht, v. 50, p. 723-735, 2003.

LEITE, D. L.; ANTHONISEN, D.; BARBIREI, R. L. Estimation of genetic divergence in pepper (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) revealed by RAPD markers. In: ANUAL MEETING OF THE POTATO ASSOCIATION OF AMERICA, 90; INTERNATIONAL SOLANACEAE CONFERENCE, 5, SOLANACEAE GENOMICS NETWORK, Madison: PAA, 2006. Disponível em: <http://cniia.inta.gov.ar/lat-sol/CPACT1%20-%20Leite%20et%20al.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2008.

MADAIL, J. C. M.; SCHNEID, L. F.; SIMA, L. F.; WENDT, A. N. Economia da produção de pimenta vermelha no município de Turuçu-RS. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 27 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 19).

NEITZKE, R. S.; HEIDEN, G.; STUMPF, E.; FISCHER, S. Z.; BARBIERI, R. L. Conhecimento popular aliado a tecnologias de preservação e desenvolvimento dos produtores de

pimenta na colônia Azevedo, em Turuçu, RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 3; SEMINÁRIO ESTADUAL DE AGROECOLOGIA, 3. Anais... Florianópolis: ABA, 2005. 1 CD-ROM.

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

PORTIS, E.; NERVO, G.; CAVALLANTI, F.; BARCHI, L.; LANTERI, S. Multivariate analysis of genetic relationships between Italian pepper landraces. *Crop Science*, Madison, v. 46, p. 2517-2525, 2006.

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

REIFSCHNEIDER, F. J. B. ; RIBEIRO, C. S. da C. . Cultivo. In: RIBEIRO, C. S. da C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C. de; HENZ, G. M.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 11-14.

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

ROHLF, F.J. NTSYS – pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, New York, 1992, 270 p.

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

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

WAGNER, C. M. Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto: implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum*. 2003. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade de São Paulo, Piracicaba.



Clima Temperado

