

PEREIRA IS; BARRETO FZ; BALSALOBRE TWA; SALA FC; COSTA CP; CARNEIRO MS. 2015. Validação de marcadores moleculares associados à pungência em pimenta. *Horticultura Brasileira* 33: 189-195. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000200009>

## Validação de marcadores moleculares associados à pungência em pimenta

Ítalo S Pereira; Fernanda Z Barreto; Thiago WA Balsalobre; Fernando C Sala; Cyro P Costa; Monalisa S Carneiro

UFSCar, Depto. Biotecnologia, Prod. Vegetal e Animal, C. Postal 153, 13600-970 Araras-SP; italo\_sudre@hotmail.com; fernandazbarreto@gmail.com; fcsala@cca.ufscar.br; thiagobalsalobre@gmail.com; monalisa@cca.ufscar.br

### RESUMO

A pungência em frutos de pimenta do gênero *Capsicum*, devido à presença de capsaicinóides, é uma das características mais atraídas e muito valorizadas pela culinária mundial. Neste trabalho, objetivou-se validar e avaliar a eficiência de predição dos marcadores moleculares *pun1<sup>1</sup>*, *pun1<sup>3</sup>* e o SNP identificado pelo método tetra-*-primer* ARMS-PCR para a determinação de pungência em acessos de *Capsicum* spp. Trinta e seis acessos do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de São Carlos foram avaliados através de análises sensoriais (em frutos maduros) e moleculares para pungência (na fase de plântula através da extração do DNA em folhas). Os marcadores SNP ARMS-PCR, *pun1<sup>1</sup>* e *pun1<sup>3</sup>* foram usados na avaliação molecular. Os resultados mostram a eficiência desses marcadores para uso de caracterização molecular de acessos de *Capsicum* spp. para o caráter pungência.

**Palavras-chave:** *Capsicum* spp., SNP, melhoramento genético, seleção.

### ABSTRACT

#### Validation of molecular markers associated with pungency in hot pepper

The pungency in hot pepper fruits of the genus *Capsicum*, due to the presence of capsaicinoids, is one of the most attractive and highly valued characteristics in the world cuisine. This work aimed to validate and evaluate the efficiency of prediction of molecular markers *pun1<sup>1</sup>*, *pun1<sup>3</sup>* and SNP identified by tetra-*-primer* ARMS-PCR method for the determination of pungency in *Capsicum* spp. Thirty six accessions of the Germplasm Bank of the Universidade Federal de São Carlos were evaluated by sensory (ripe fruits) and molecular (at seedling stage by DNA extraction from leaves) analyses for pungency. The SNP ARMS-PCR, *pun1<sup>1</sup>* and *pun1<sup>3</sup>* markers were used for molecular evaluation. The results show the efficiency of using these markers for molecular characterization of *Capsicum* spp. accessions for pungency character.

**Keywords:** *Capsicum* spp., SNP, crop breeding, selection.

(Recebido para publicação em 17 de dezembro de 2014; aceito em 7 de janeiro de 2015)

(Received on December 17, 2014; accepted on January 7, 2015)

As pimentas do gênero *Capsicum* são consideradas o condimento picante mais importante do mundo, sendo consumido por um quarto da população mundial (Carvalho *et al.*, 2006). Apresenta grande importância econômica por sua rentabilidade quando se agrega valor ao produto e/ou por sua importância social, como exemplo prático de agricultura familiar e com grande geração de empregos. O cultivo desta hortaliça tem se tornado um importante segmento no setor agrícola no país devido à crescente demanda do mercado consumidor (Sudré & Gonçalves, 2010).

No Brasil a produção de pimenta é caracterizada, em sua maioria, por um grande número de pequenos agricultores, tendo esta espécie como principal fonte de renda ou uma alternativa para

sua complementação. Assim, não se tem um valor exato da produção de pimenta, mas estima-se uma área de aproximadamente 5 mil hectares com uma produção de 75 mil toneladas (Pinheiro *et al.*, 2012).

Pimentas pertencentes ao gênero *Capsicum* têm como centro de origem e domesticação a América. Dentre as espécies deste gênero, cinco são domesticadas sendo largamente cultivadas e utilizadas pelo homem: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*. (Carvalho *et al.*, 2006). Essas espécies possuem grande variabilidade fenotípica além de terem grande versatilidade de usos. Seus frutos podem ser comercializados para consumo *in natura* além de atender à indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

Devido ao aumento da demanda por esses frutos, associado com a carência de genótipos melhorados para as condições brasileiras, os programas de melhoramento genético de *Capsicum* têm concentrado esforços no desenvolvimento de cultivares adaptadas ao Brasil. Dentre as características de importância econômica, a pungência é o principal atrativo deste gênero, sendo conferida por substâncias alcalóides denominadas capsaicinóides. Esses alcalóides têm sido amplamente estudados (Henry & Emery, 1986; Caterina, 2000; Blum *et al.*, 2002; Daood *et al.*, 2002) sendo sintetizados no tecido da placenta e armazenados em células epidérmicas (Garcés-Claver *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2007).

Para determinação da pungência

em frutos de pimenta, diversas técnicas podem ser empregadas, como análise sensorial e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Entretanto, todas essas técnicas necessitam do fruto para realização da análise, ficando exposto a diversos fatores que podem dificultar a avaliação, como o crescimento da planta não ocorrer conforme o previsto, haver alteração do teor de capsaicinóides em função de condições ambientais adversas (Curry *et al.*, 1999; Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002) ou o número de frutos ser insuficiente para realização do teste (Stellari *et al.*, 2010). Nestes casos uma alternativa para avaliação da pungência é o uso de marcadores moleculares, onde a análise pode ser realizada em estágios iniciais de desenvolvimento da plântula, utilizando apenas folhas jovens e, com isso, reduzindo o tempo para verificação dos genótipos (Garcés-Claver *et al.*, 2007).

A determinação de pungência através de marcadores moleculares foi realizada a partir do loco *Pun1* (Stellari *et al.*, 2010; Wyatt *et al.*, 2012), principal gene responsável pela biossíntese de capsaicinóides, sendo o único loco conhecido, até o momento, com efeito quantitativo sobre o acúmulo de pungência (Blum *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2006; Stellari *et al.*, 2010). Neste loco foram encontradas três mutações (deleções) que apresentaram uma resposta espécie-específica para pungência em pimenta. A primeira mutação, o alelo *pun1<sup>1</sup>* presente apenas na espécie *C. annuum*, possui uma deleção de 2,5Kb, causando a perda do possível promotor e a maior parte do primeiro éxon, impossibilitando que o gene possa ser transcrito ou traduzido (Wyatt *et al.*, 2012). A segunda mutação *pun1<sup>2</sup>*, presente em *C. chinense*, é caracterizada por uma deleção no primeiro éxon, causando um códon de stop, sendo que este alelo é transcrito mas nenhuma proteína é produzida (Wyatt *et al.*, 2012). A terceira mutação, alelo conhecido como *pun1<sup>3</sup>*, específico para *C. frutescens*, possui uma grande deleção no final da região do gene, que resultaria numa perda de 70 aminoácidos da proteína de *Pun1*. O alelo *pun1<sup>3</sup>* não é transcrito ou traduzido (Stellari *et*

*al.*, 2010). Também foi encontrada uma região paráloga ao loco *Pun1*, com 82% de identidade, sendo denominada de *catf2* (Lang *et al.*, 2006). Nesta região foi encontrado um polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) que detecta a mudança de uma única base G/T que representa a presença ou ausência da pungência, respectivamente, detectadas pela técnica de sistema de amplificação refratária da mutação (*Amplification Refractory Mutation System - ARMS-PCR*) (Newton *et al.*, 1989), utilizando quatro *primers* em uma mesma reação de amplificação (*tetra-primer ARMS-PCR*) (Ye *et al.*, 2001). Este marcador não possui o caráter espécie-específico, uma vez que a variação SNP pode ser avaliada em diferentes espécies do gênero *Capsicum*.

A caracterização molecular tem sido uma ferramenta útil para a avaliação da diversidade genética de diferentes espécies vegetais (Ferreira *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2013). Marcadores moleculares têm sido usados nessa caracterização auxiliando em processos de coleta, conservação e intercâmbio de acessos em Bancos de Germoplasma de espécies vegetais, bem como na seleção de genitores a serem utilizados em programas de melhoramento. Informações a respeito da caracterização servem para aumentar a eficiência dos trabalhos de melhoramento de espécies cultivadas, conhecer a variabilidade existente, gerar informações úteis para preservação e uso dos genótipos, além de possibilitar a identificação de possíveis duplicatas (Geleta *et al.*, 2005).

O objetivo deste estudo foi validar e avaliar a eficiência de predição dos marcadores moleculares *pun1<sup>1</sup>*, *pun1<sup>3</sup>* e o SNP identificado pelo método *tetra-primer ARMS-PCR* para a determinação de pungência em acessos de *Capsicum* spp. do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de São Carlos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e cinco acessos pertencentes a cinco espécies (13 acessos de *Capsicum annuum*, 10 de *C. baccatum*, 10 de *C.*

*chinense*, um de *C. frutescens* e um de *C. pubescens*) e um híbrido F<sub>1</sub> experimental foram utilizados neste trabalho (Tabela 1), sendo todos os genótipos oriundos do Banco de Germoplasma de *Capsicum* da UFSCar. Os acessos utilizados no presente trabalho foram obtidos por autofecundação durante a manutenção do Banco de Germoplasma, exceto o híbrido experimental. Como controle negativo das análises sensoriais e moleculares para pungência foram utilizadas uma cultivar de tomate (Santa Clara), um de berinjela (F<sub>1</sub> Ciça) e um de quiabo (Santa Cruz).

Cada acesso foi semeado em bandejas de 200 células preenchidas com substrato Bioplant® e mantidas em ambiente protegido, sob irrigação por aspersão para obtenção das mudas. Após 45 dias as mudas foram transplantadas para vasos de 1 L e, mantidas durante cinco meses sob irrigação por aspersão em ambiente protegido. Para analisar a pungência dos frutos, coletou-se 10 frutos maduros de cada acesso. Em cada fruto, realizou-se um corte transversal para os provadores analisarem a presença da pungência através do contato da língua com a placenta, sendo cada acesso avaliado por três provadores. Na análise sensorial os acessos foram classificados como frutos pungentes (P) e não pungentes (NP), sendo considerado pungente o acesso que provocasse ardência durante a prova.

A extração do DNA genômico total, com 200 mg de folhas de plântulas jovens, foi realizada de acordo Doyle & Doyle (1987) com modificações e adaptado para quantidades pequenas de tecido, tal como descrito por Arnedo-Andrés *et al.* (2002). As amostras foram quantificadas em gel de agarose 1% através de comparação com concentrações conhecidas do DNA do fago lambda ( $\lambda$ ), diluídas conforme proposto por Vilella *et al.* (2014) e armazenadas em freezer a -20°C.

Foram avaliados três loci específicos para determinação da pungência molecular em *Capsicum* ssp.: *pun1<sup>1</sup>*, *pun1<sup>3</sup>* e o SNP identificado por *tetra-primer ARMS-PCR*. A variação SNP identifica pungência em diversas espécies do gênero *Capsicum* e, devido a esta propriedade, foi utilizada inicialmente

para a avaliação molecular dos acessos estudados. As amplificações dos loci foram realizadas com os *primers* descritos na literatura (Tabela 2) após otimizações como apresentadas a seguir:

Loco *pun1<sup>1</sup>*: volume total de 25 µL, contendo 200 ng de DNA, 0,7 µM dos *primers* *pun1<sup>1</sup> fwd1*, *pun1<sup>1</sup> fwd2* e *pun1<sup>1</sup> rev*, 400 µM de dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 1X, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, bem como a separação dos produtos amplificados foram realizados como proposto por Wyatt *et al.* (2012).

Loco *pun1<sup>3</sup>* (Wyatt *et al.*, 2012) com modificações: volume total de 25 µL, contendo 200 ng de DNA, 0,7 µM dos *primers* *pun1<sup>3</sup> fwd*, *pun1<sup>3</sup> rev1* e *pun1<sup>3</sup> rev2*, 400 µM de dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 1X, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, bem como a separação dos produtos amplificados foram realizados como proposto por Wyatt *et al.* (2012).

Tetra-*primer* ARMS-PCR (Garcés-Claver *et al.*, 2007) com modificações: volume total de 20 µL contendo 60 ng de DNA, 0,75 µM de *primers* FI e RO, 1,75 µM de *primers* FO e RI, 200 µM dNTPs, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, tampão 1X, e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. As etapas da amplificação foram: 95°C por 1 min seguidos de 18 ciclos de 95°C por 1 min, 72°C por 1 min (reduzindo 1°C por ciclo) mais 72°C por 1 min, logo após mais 16 ciclos a 95°C por 1 min, 54°C por 1 min e 72°C por 1 min finalizando com 72°C a 2 minutos. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose MetaPhor 2,5% e corado com brometo de etídio.

A análise dos resultados foi feita avaliando a presença de fragmentos específicos dos marcadores moleculares e comparando com a resposta obtida através das análises sensoriais da pungência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises sensoriais dos 36 acessos de pimenta encontram-se sumarizados na Tabela 1. Não houve discordância entre os três provedores na determinação da pungên-

cia para acessos avaliados. A análise sensorial dos 36 acessos de pimenta (35 espécies de *Capsicum* e um híbrido experimental) mostrou que 29 acessos (80,6%) foram pungentes e sete acessos (19,4%) não pungentes. *C. annuum* possui a maior diversidade fenotípica entre os acessos, sendo que nove (69,23%) foram classificados como pungentes e quatro (30,77%) como não pungentes. Em *C. chinense*, sete (70%) foram pungentes e três (30%) não pungentes. Foram considerados pungentes todos os acessos de *C. baccatum*, *C. frutescens* e o híbrido experimental. Os controles negativos (quiabo, tomate e berinjela) foram determinados como não pungentes nas análises sensoriais e não amplificaram qualquer fragmento para os marcadores moleculares avaliados.

Na avaliação molecular, pelo método de tetra-*primer* ARMS-PCR, três fragmentos (191 pb, 134 pb e 108 pb) foram amplificados. O fragmento 134 pb representou o alelo G e o fragmento 108 pb correspondeu ao alelo T em acessos não pungentes e pungentes, respectivamente. Finalmente, o fragmento 191 pb foi comum a todos os acessos do gênero *Capsicum* spp. evidenciando um fragmento gênero-específico. Em *C. annuum*, o loco espécie-específico *pun1<sup>1</sup>*, apresentou dois fragmentos, 1063 pb e 746 pb, os quais indicaram pungência e não pungência, respectivamente. No caso de *pun1<sup>3</sup>* (*C. frutescens*) pungência foi associada ao fragmento de 586 pb e a não pungência ao fragmento de 1033 pb.

A avaliação molecular dos 36 acessos, através do SNP identificado pela técnica tetra-*primer* ARMS-PCR (Tabela 1), mostrou que 30 acessos apresentaram o fragmento de 108 pb indicando a pungência (presença do alelo T), ao passo que seis acessos apresentaram o fragmento de 134 pb associado a não pungência (presença do alelo G). O SNP conseguiu prever em 93,10% dos acessos avaliados para pungência caracterizada através de análise sensorial (Tabela 3). Este resultado mostra a alta eficiência deste marcador como diagnóstico de pungência em pimentas.

Nos 13 acessos de *C. annuum*, sete (53,84%) foram classificados como pungentes e seis (46,16%) como não

pungentes. Todos os acessos de *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* e o híbrido foram considerados pungentes.

Os acessos CCA 34 e CCA 105 (*C. annuum*) apresentaram o fragmento de 134 pb que identificou a não pungência (presença do alelo G), discordando da resposta obtida através da análise sensorial onde a pungência foi detectada (Tabela 1). Exemplo semelhante também foi encontrado com a cultivar Biquinho (*C. chinense*) e os acessos CCAF4 45 e CCAF4 72 que foram caracterizados como não pungentes na avaliação sensorial e, no entanto, apresentaram o fragmento de 108 pb que identifica a pungência (presença do alelo T).

O loco *pun1<sup>1</sup>*, específico de *C. annuum*, identificou oito acessos pungentes (presença do fragmento de 1063 pb) do total de 13 acessos desta espécie. Os acessos CCA 29, CCA 34 e CCA 105 apresentaram divergência entre a resposta do marcador molecular e da análise sensorial (Tabela 1). O loco *pun1<sup>1</sup>* permitiu correlacionar em 77,77% a resposta da pungência obtida através da análise molecular e sensorial dos acessos avaliados de *C. annuum* (Tabela 3).

Na avaliação com o loco *pun1<sup>3</sup>*, específico de *C. frutescens*, a amplificação do fragmento de 586 pb comprovou a pungência detectada para o acesso de CCA 176 via análise sensorial. Estes resultados para os loci *pun1<sup>1</sup>* e *pun1<sup>3</sup>* corroboram com a especificidade descrita para estes marcadores com os respectivos gêneros *C. annuum* e *C. frutescens* (Wyatt *et al.*, 2012).

As divergências entre as respostas das avaliações moleculares e das análises sensoriais ocorreram, principalmente, devido a fenótipos classificados como não pungentes na análise sensorial. Este resultado indica uma provável falta de sensibilidade por parte dos provedores para realizar a caracterização de pungência em frutos de *Capsicum* spp. Stellari *et al.* (2010) mostraram que a pungência só é detectável por análise sensorial quando apresenta níveis superiores a 10 ppm. Assim é possível, nestes casos, que a pungência esteja presente no fruto, porém a níveis controlados que não são detectáveis pela análise sensorial. Este

**Tabela 1.** Avaliação de trinta e seis acessos de *Capsicum* e três representantes da família Solanaceae pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal de São Carlos para reação a pungência através do método sensorial e de marcadores moleculares *pun1<sup>l</sup>* e SNP (tetra-primer ARMS-PCR) (assessment of thirty-six *Capsicum* accessions and three Solanaceae family representatives belonging to Germplasm Bank of Universidade Federal de São Carlos for reaction to pungency through the sensory method and molecular markers *pun1<sup>l</sup>* and SNP (tetra-primer ARMS-PCR). Araras, UFSCar, 2014.

Acessos	Espécie	Origem	Análise Sensorial	SNP**	<i>pun1<sup>l</sup>*</i>
CCA 1	<i>C. annuum</i>	Filipinas	P	P (T)	P
CCA 2	<i>C. annuum</i>	Filipinas	P	P (T)	P
CCA 8	<i>C. annuum</i>	Brasil	P	P (T)	P
CCA 13	<i>C. annuum</i>	Brasil	NP	NP (G)	NP
CCA 17	<i>C. annuum</i>	Brasil	NP	NP (G)	NP
CCA 20	<i>C. annuum</i>	Brasil	NP	NP (G)	NP
CCA 29	<i>C. annuum</i>	Brasil	NP	NP (G)	P
CCA 34	<i>C. annuum</i>	México	P	NP (G)	NP
CCA 36	<i>C. annuum</i>	Brasil	P	P (T)	P
CCA 99	<i>C. annuum</i>	Brasil	P	P (T)	P
CCA 105	<i>C. annuum</i>	Brasil	P	NP (G)	NP
CCA 106	<i>C. annuum</i>	Brasil	P	P (T)	P
CCA 560	<i>C. annuum</i>	Brasil	P	P (T)	P
CCA 554	<i>C. baccatum</i>	Brasil	P	P (T)	-
CCA 528	<i>C. baccatum</i>	Colômbia	P	P (T)	-
CCA 544	<i>C. baccatum</i>	Brasil	P	P (T)	-
CCA 424	<i>C. baccatum</i>	Brasil	P	P (T)	-
CCA 113	<i>C. baccatum</i>	Brasil	P	P (T)	-
Tomate		Brasil	NP	-	-
Quiabo		Brasil	NP	-	-
CCA 530	<i>C. baccatum</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA 112	<i>C. baccatum</i>	Peru	P	P (T)	
CCA 555	<i>C. baccatum</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA 415	<i>C. baccatum</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA 471B	<i>C. baccatum</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA F4 45	<i>C. chinense</i>	Brasil	NP	P (T)	
CCA F4 72	<i>C. chinense</i>	Brasil	NP	P (T)	
Buth Jolokoia	<i>C. chinense</i>	Brasil	P	P (T)	
F <sub>1</sub> (CCA F4 45 X Biquinho)	<i>C. chinense</i>	Brasil	P	P (T)	
MURUPI	<i>C. chinense</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA 124	<i>C. chinense</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA 144	<i>C. chinense</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA 145	<i>C. chinense</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA 504	<i>C. chinense</i>	Brasil	P	P (T)	
CCA 518	<i>C. chinense</i>	Brasil	P	P (T)	
Biquinho	<i>C. chinense</i>	Brasil	NP	P (T)	
CCA 176	*** <i>C. frutescens</i>	Brasil	P	P (T)	
Rocoto	<i>C. pubescens</i>	Peru	P	P (T)	
Berinjela		Brasil	NP	-	

\*Marcador específico para acessos de *Capsicum annuum* (specific marker for accessions of *Capsicum annuum*); \*\*Marcador SNP (tetra-primer ARMS-PCR) indicado para todas as espécies do Gênero *Capsicum* [SNP marker (tetra-primer ARMS-PCR) suitable for all species of *Capsicum* genus]; \*\*\*Marcador *pun1<sup>l</sup>*, específico para *C. frutescens*, também caracterizou o acesso CCA 176 como pungente (Marker *pun1<sup>l</sup>*, specific for *C. frutescens*, also characterized access CCA 176 as pungent); Tomate: *Solanum lycopersicon*, cv. Santa Clara (tomato: *Solanum lycopersicon*, cv. Santa Clara); Quiabo: *Abelmoschus esculentus*, cv. Santa Cruz (okra: *Abelmoschus esculentus*, cv. Santa Cruz); Berinjela: *Solanum melongena* cv. F<sub>1</sub> Ciça (eggplant: *Solanum melongena*, cv. F<sub>1</sub> Ciça); Pungente (P) e não pungente (NP) (pungent (P) and not pungent (NP)].

**Tabela 2.** Primers dos marcadores moleculares *pun1<sup>1</sup>*, *pun1<sup>3</sup>* e o SNP (tetra-primer ARMS-PCR) utilizados para a determinação de pungência em *Capsicum* spp. [primers of molecular markers *pun1<sup>1</sup>*, *pun1<sup>3</sup>* and SNP (tetra-primer ARMS-PCR) used for the determination of pungency in *Capsicum* spp.]. Araras, UFSCar, 2014.

Primer	Sequência (5' à 3')	Referência
<i>pun1<sup>1</sup></i> fwd1	TCCTCATGCATCTCTTGCAG	Wyatt <i>et al.</i> (2012)
<i>pun1<sup>1</sup></i> fwd2	GCTCCACGGAAAAGACTCAT	Wyatt <i>et al.</i> (2012)
<i>pun1<sup>1</sup></i> rev	CAAATGGCAGTTTCCCTTCTCTCATT	Wyatt <i>et al.</i> (2012)
<i>pun1<sup>3</sup></i> fwd	GTAGTTTTTCGGAAATGAAAAGTACT	Wyatt <i>et al.</i> (2012)
<i>pun1<sup>3</sup></i> rev1	CACGCCTTGCCAGCTTTGTAATCTT	Wyatt <i>et al.</i> (2012)
<i>pun1<sup>3</sup></i> rev2	TCATGTCCATTCGGCCAAACAGTG	Wyatt <i>et al.</i> (2012)
fwd outer (FO)	GTGATGTTGCACAAGCAACA	Garcés-Claver <i>et al.</i> (2007)
fwd inner (FI)	TTATTGCCAATTAATCCAAAGTCTG	Garcés-Claver <i>et al.</i> (2007)
rev outer (RO)	GACCGTAAACTTCCGTTGAAA	Garcés-Claver <i>et al.</i> (2007)
rev inner (RI)	TTCAATCAAACATCCAGTTACTTCA	Garcés-Claver <i>et al.</i> (2007)

**Tabela 3.** Associação entre análises sensoriais e de marcadores moleculares para a determinação da pungência em 36 acessos de *Capsicum* spp. (association between sensory analysis and molecular markers for determining the pungency in 36 *Capsicum* spp accessions). Araras, UFSCar, 2014.

Marcador SNP (tetra-primer ARMS-PCR) ( <i>Capsicum</i> spp.)					
Acessos pungentes (P)			Acessos não pungentes (NP)		
Análise sensorial	Análise molecular <sup>1</sup>	Predição do marcador (%)	Análise sensorial	Análise molecular <sup>3</sup>	Predição do marcador (%)
29	27	93,10*	7	4	57,14
Marcador <i>pun1<sup>1</sup></i> ( <i>Capsicum annuum</i> )					
Análise sensorial	Análise molecular <sup>2</sup>	Predição do marcador (%)	Análise sensorial	Análise molecular <sup>4</sup>	Predição do marcador (%)
9	7	77,77	4	3	75,00

\*Porcentagem de associação entre as análises sensoriais e os marcadores moleculares na determinação da pungência. (percentage of association between the sensory analysis and molecular markers in determining pungency); <sup>1</sup>Presença do fragmento de 108 pb referente ao marcador SNP (tetra-primer ARMS-PCR) [presence of the 108 bp fragment related to the SNP marker (tetra-primer ARMS-PCR)]; <sup>2</sup>Presença do fragmento de 1063 pb referente ao marcador *pun1<sup>1</sup>* (presence of the 1063 bp fragment related to *pun1<sup>1</sup>* marker); <sup>3</sup>Presença do fragmento de 134 pb referente ao marcador SNP (tetra-primer ARMS-PCR) [presence of the 134 bp fragment related to the SNP marker (tetra-primer ARMS-PCR)]; <sup>4</sup>Presença do fragmento de 746 pb referente ao marcador *pun1<sup>1</sup>* (presence of the fragment of 746 bp related to *pun1<sup>1</sup>* marker).

tipo de teste, embora possa parecer o método mais rápido e econômico, envolve algumas dificuldades para os provadores, dadas as sensações envolvidas. Torna-se evidente, dada à subjetividade humana, a possibilidade de imprecisão deste teste. Um problema adicional é o fato desta análise não permitir a distinção entre os diferentes capsaicinóides presentes no fruto.

Nesses casos de falso negativo na análise sensorial e positivo para o marcador é importante ressaltar que a detecção de capsaicinóides nos frutos varia em função do genótipo e das condições ambientais (Curry *et al.*, 1999; Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002). Pesquisas indicam uma diferença significativa

nos teores de pungência quanto à resposta dos genótipos de pimenta submetidos a diferentes ambientes e também quando colhidos em diferentes épocas. O teor de capsaicinóides aumenta gradualmente nos dias após o vingamento do fruto com o aumento da atividade da capsaicina-sintetase, decrescendo posteriormente, devido ao aumento da atividade enzimática da peroxidase o que torna a época de colheita um parâmetro determinante para a pungência do fruto (Contreras-Padilla & Yahia, 1998; Estrada *et al.*, 1999; Zewdie & Bosland, 2000; Estrada *et al.*, 2002).

Sendo assim, os melhoristas podem selecionar e desenvolver variedades com diferentes níveis de pungência a

partir do controle de manejo da cultura. Dickerson (1997) demonstrou que uma maior disponibilidade de água se correlacionava negativamente com a pungência ao contrario da temperatura que tem um efeito positivo sobre a pungência. Além disso, diversos estudos mostram o efeito aditivo do gene *Pun1* sobre a pungência (Stewart *et al.*, 2005; Stellari *et al.*, 2010).

Por outro lado, podem ocorrer divergências entre as análises sensoriais e avaliações moleculares devido à detecção da ardência durante a análise sensorial e ausência de fragmentos dos marcadores moleculares associados à pungência. Isto pode ter acontecido porque é provável que a expressão da

pungência seja devido à ação de outros genes envolvidos na determinação de capsaicinóides. Diversos estudos atribuem à existência de um complexo poligênico que regularia a expressão da pungência (Yagishita *et al.*, 1990; Zewdie & Bosland, 2000). Alguns estudos (Blum *et al.*, 2003; Ben-Chaim *et al.*, 2006) têm realizado o mapeamento de loci de características quantitativas (*Quantitative Trait Loci*, QTL) (Tanksley, 1993 Barchi *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012; Dwierdi *et al.*, 2013) associados à pungência na tentativa de localizar um possível complexo de genes moduladores da pungência via marcadores genéticos onde poderá ser verificado com maior confiabilidade a presença de mais de um gene interferindo no controle do caráter, o que certamente irá auxiliar na melhor detecção da pungência em pimenta.

No acesso CCA 29 os marcadores SNP (tetra-*primer* ARMS-PCR) e *pun1<sup>l</sup>* apresentaram resultados divergentes. O marcador SNP classificou o acesso como não pungente, presença do alelo G. Ao passo que o marcador *pun1<sup>l</sup>* classificou como pungente, presença do fragmento de 1063 pb o qual indica que não houve deleção no primeiro exón. Uma possível explicação é que, como a região onde o SNP foi localizado (*Catf2*) é paráloga a *Pun1* e desta forma não segregam juntos, existe a hipótese que a divergência observada, a princípio, possa ser em decorrência de um evento raro de mutação na região *Catf2*. Esta mutação não reflete a perda de pungência na região de *Pun1*, o qual foi detectado sem alteração por deleção.

O híbrido experimental F<sub>1</sub> (CCA F4 45 x ‘Biquinho’) obtido pelo cruzamento de materiais de *C. chinense* não pungentes para análise sensorial, foi caracterizado sensorialmente como pungente. ‘Biquinho’ é uma cultivar amplamente utilizada no cultivo de pimenta no Brasil e conhecida como pimenta “que não arde” ou pimenta doce, devido à produção de frutos não pungentes. Em trabalho realizado por Domenico *et al.* (2012), avaliando o conteúdo de capsaicina em frutos frescos da pimenta IAC 1643 (‘Biquinho’) pela técnica de HLPC, não detectaram a presença de capsaicina nos frutos, caracterizando-a

como uma pimenta sem ardor. Entretanto, a determinação molecular através de tetra-*primer* ARMS-PCR identificou a pungência para os dois genitores e para o híbrido.

Ribeiro & Costa (1990) verificaram a existência de herança genética quantitativa para pungência na espécie *C. chinense*. Foram encontrados valores altos de herdabilidade no sentido restrito para determinação da pungência em duas populações de pimenta. A ocorrência de segregação transgressiva na geração F<sub>2</sub> e as estimativas dos componentes genéticos de variância indicaram que o conteúdo de capsaicina é controlado por vários genes de ação aditiva. Sendo assim, para a produção de híbridos não pungentes de pimenta doce desta espécie é necessário identificar linhagens isogênicas para não pungência, utilizando ambos progenitores não pungentes.

Atualmente, as técnicas espectrofotométricas e cromatográficas, por serem mais precisas, são utilizadas para compreensão das relações bioquímicas envolvidas em vias metabólicas de interesse (Hoffman *et al.*, 1983; Cooper *et al.*, 1991; Garcés-Claver *et al.*, 2006; Thapa *et al.*, 2009; Al Othman *et al.*, 2011). No caso específico de pimenta, é importante que as avaliações fenotípicas representem corretamente os níveis de pungência nas diferentes gerações. Sabendo que a pungência tem efeito aditivo, a utilização de técnicas com marcadores moleculares para a seleção de genótipos em cruzamentos pode ser bastante eficiente. Com isso, os marcadores moleculares podem auxiliar na orientação para realização de cruzamentos entre genitores não pungentes fenotipicamente com o intuito de obter uma população segregante para pungência. No presente trabalho, a utilização da análise sensorial aliada ao marcador molecular para determinação da pungência foi eficiente além de possuir menor custo quando comparado às técnicas espectrofotométricas e cromatográficas.

Normalmente, a obtenção de cultivares pungentes de pimenta exige a realização de cruzamentos e a avaliação de populações segregantes. Essas etapas envolvem um tempo demorado, trabalho intensivo no cuidado das plantas, demanda de área experimental e métodos

eficientes de avaliação do conteúdo de capsaicinóides nos frutos. A seleção assistida por marcadores é uma poderosa ferramenta para selecionar indivíduos pungentes entre populações segregantes em estágios precoces do desenvolvimento das plantas, antes mesmo do aparecimento dos frutos, de forma mais eficiente e precisa (Tanaka *et al.*, 2014). Além disso, os marcadores moleculares relacionados com pungência em pimenta podem ser úteis na caracterização molecular de acessos em bancos de germoplasma, gerando informações para orientação de cruzamentos dentro do programa de melhoramento.

Com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que a predição dos marcadores SNP e *pun1<sup>l</sup>* em detectar pungência em *Capsicum* ssp. foi alta. Houve comprovação da eficácia dos marcadores moleculares na detecção precoce da pungência em frutos de *Capsicum* ssp. Estes estudos, além de auxiliar no melhor entendimento da genética destas espécies, são grandes aliados dos programas de melhoramento genético de pimentas podendo reduzir custos aumentando a eficiência dos cruzamentos e seleção indireta de genótipos de interesse econômico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a bolsa de iniciação (Pereira IS) do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), concedida no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - UFSCar.

## REFERÊNCIAS

- AL OTHMAN ZA; AHMED YB; HABIL MA; GHAFAR AA. 2011. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules* 16: 8919-8929.
- ARNEDO-ANDRÉS S; GIL-ORTEGA, R; LUIS-ARTEAGA, M; HORMAZA, I. 2002. Development of RAPD and SCAR markers linked to the Pvr4 locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1067-1074.
- BARCHI, L; LEFEBVRE, V; SAGE-PALLOIX, A; LANTERI, S; PALLOIX, A. 2009. QTL analysis of plant development and fruit traits in pepper and performance of selective phenotyping. *Theoretical and Applied*

- Genetics*. 118: 1157–1171.
- BEN-CHAIM, A; BOROVSKY, Y; FALISE, M; MAZOUREK, M; KANG, B; PARAN, I; JAHN, M. 2006. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 113: 1481–1490.
- BLUM, E; LIU, K; MAZOUREK, M.; YOO, EY; JAHN, M; PARAN, I. 2002. Molecular mapping of the C locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 705: 702–705.
- BLUM, E; MAZOUREK, M; O'CONNELL, M; CURRY, J; THORUP, T; LIU, K; JAHN, M; PARAN, I. 2003. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 79–86.
- CARVALHO, SIC; BIANCHETTI, LB; RIBEIRO, CSC; LOPES, CA. 2006. *Pimentas do gênero Capsicum no Brasil*. [S.l: s.n.].
- CATERINA, MJ. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306–313.
- CONTRERAS-PADILLA, M; YAHIA, EM. 1998. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46: 2075–2079.
- COOPER, TH; GUZINSKI, JA; FISHER, C. 1991. Improved high-performance liquid chromatography method for determination of major capsaicinoids in *Capsicum oleoresins*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 39: 2253-2256.
- CURRY, J; ALURU, M; MENDOZA, M; NEVAREZ, J; MELENDREZ, M; O'CONNELL, MA. 1999. Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science* 148: 47–57.
- DAOOD, HG; ILLÉS, V; GNAYFEED, MH; MÉSZÁROS, B; HORVÁTH, G; BIACS, PA. 2002. Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane. *The Journal of Supercritical Fluids* 23: 143-152.
- DICKERSON, G. W. 1997. Growing peppers in New Mexico gardens. Guide H-240. Cooperative Extension Service, College of Agriculture and Home Economics, New Mexico State University. Disponível em: <aces.nmsu.edu/pubs/\_h/h-240.html>. Acesso em 24 de fev. 2014.
- DOMENICO CI; COUTINHO JP; GODOY HT; MELO AMT. 2012. Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. *Horticultura Brasileira* 30: 466-472.
- DOYLE, JJ; DOYLE, JL. 1987. DNA isolation from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- DWIERDI, N; KUMAR, R; PALIWAL, R; KUMAR, U; KUMAR, S; SINGH, M; SINGH, RK. 2013. QTL mapping for important horticultural traits in pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. Publicação on line: DOI: 10.1007/s13562-013-0247-1.
- ESTRADA, B; BERNAL, MA; DÍAZ, J; POMAR, F; MERINO, F. 2002. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annum* L. in relation to fruiting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1188–1191.
- ESTRADA, B; POMAR, F; DIAZ, J; MERINO, F; BERNAL, M. 1999. Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. *Scientia Horticulturae* 81: 385–396.
- FERREIRA, M.E.; MORETZSOHN, M.C.; BUSO, G.S. C. 2007. Fundamentos da caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: Nass, L.L. (org) Recursos genéticos vegetais. Brasília, *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. 377-420p.
- GARCÉS-CLAVER, A; ARNEDO-ANDRÉS, MS; ABADÍA, J; GIL-ORTEGA, R; ÁLVARES-FERNÁNDEZ, A. 2006. Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruits by Liquid Chromatography–Electrospray/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9303–9311.
- GARCÉS-CLAVER, A; FELLMAN, SM; GIL-ORTEGA, R; JAHN, M; ARNEDO-ANDRÉS, MS. 2007. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 907–916.
- GELETA, L.F.; LABUSCHAGNE, M.T.; VILJOEN, C.D. 2005. Genetic variability in pepper (*Capsicum annum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. *Biodiversity and Conservation* 14: 2361-2375.
- HENRY, CJ; EMERY, B. 1986. Effect of spiced food on metabolic rate. *Human nutrition. Clinical nutrition* 40: 165–168.
- HILL, TA; ASHRAFI, H; REYES-CHIN-WO, S; YAO, J; STOFFEL, K; TRUCO, M-J; KOZIK, A; MICHELMORE, RW; VAN DEYNZE, A. 2013. Characterization of *Capsicum annum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30 K unigene pepper genechip. *PLoS One* 8: e56200. Publicação on line: DOI:10.1371/journal.pone.0056200.
- HOFFMAN, PG; LEGO, MC; GALETTO, WG. 1983. Separation and quantitative of red pepper major heat principles by reverse-phase high pressure liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 31: 1326-1330.
- KIRSCHBAUM-TITZE, P; HIEPLER, C; MUELLER-SEITZ, E; PETZ, M. 2002. Pungency in paprika (*Capsicum annum*) 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1260–1263.
- LANG, Y; YANAGAWA, S; SASANUMA, T; SASAKUMA, T. 2006. A Gene encoding a putative acyl-transferase involved in pungency of *Capsicum*. *Breeding Science* 56: 55–62.
- LU, FH; KWON, SW; YOON, MY; KIM, KT; CHO, MC; YOON, MK; PARK, YJ. 2012. SNP marker integration and QTL analysis of 12 agronomic and morphological traits in F8 RILs of pepper (*Capsicum annum* L.). *Molecules and Cells* 34: 25–34.
- NEWTON, CR; GRAHAM, A; HEPTINSTALL, LE; POWELL, SJ; SUMMERS, C; KALSHEKER, N; SMITH, JC; MARKHAM, AF. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*. 17: 2503–2516.
- PINHEIRO, JB; AMARO, GB; PEREIRA, RB. 2012. Nematóides em pimentas do gênero *Capsicum*. Brasília: *Embrapa Hortaliças*. 9p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 104).
- RIBEIRO, A; COSTA, CP. 1990. Inheritance of pungency in *Capsicum chinense* JACQ. (Solanaceae). *Revista Brasileira de Genética*. 13: 815-823.
- STELLARI, GM; MAZOUREK, M; JAHN, MM. 2010. Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. *Heredity* 104: 460–471.
- STEWART, C; KANG, BC; LIU, K; MAZOUREK, M; MOORE, SL; YOO, EY; KIM, BD; PARAN, I; JAHN, MM. 2005. The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 42: 675–688.
- STEWART, C; MAZOUREK, M; STELLARI, GM; O'CONNELL, M; JAHN, M. 2007. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus. *Journal of Experimental Botany* 58: 979–991.
- SUDRÉ, C; GONÇALVES, L. 2010. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp. as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*. 9: 283–294.
- TANAKA Y; YONEDA H; HOSOKAWA M; MIWA T; YAZAWA S. 2014. Application of marker-assisted selection in breeding of a new pepper cultivar (*Capsicum annum*) containing capsaicinoids low pungent capsaicinoid analogs. *Scientia Horticulturae* 165: 242-245.
- TANKSLEY SD. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*. 27: 205-233.
- THAPA, B; SKALKO-BASNET, N; TAKANO, A; MASUDA, K; BASNET, P. 2009. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Capsaicin Content in 16 Capsicum Fruits from Nepal. *Journal of Medicinal Food*. 12: 908-913.
- VILLELA JCB; BARBIERI RL; CASTRO CM; NEITZKE RS; VASCONCELOS CS; CARBONARI T; MISTURA CC; PRIORI D. 2014. Caracterização molecular de pimentas crioulas (*Capsicum baccatum*) com marcadores microsatélites. *Horticultura Brasileira* 32: 131-137
- WYATT, LE; EANNETTA, NT; STELLARI, GM; MAZOUREK, M. 2012. Development and application of a suite of non-pungency markers for the *Pun1* gene in pepper (*Capsicum* spp.). *Molecular Breeding*. 30: 1525–1529.
- YAGISHITA, N; HIRATA, Y; MIZUKAMI, H; OHASHI, H; YAMASHITA, K. 1990. Genetic nature of low capsaicin content in the variant strains induced by grafting in *Capsicum annum* L. *Euphytica*. 46: 249–252.
- YE, S; SAHAR, D; XIAYI, K; ANDREW, RC; DAY, INM. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*. 29: 88–94.
- ZEWDIE, Y; BOSLAND, P. 2000. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annum* L. *Euphytica*. 111: 185–190.