



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – DCB
CURSO DE AGRONOMIA

**RESISTÊNCIA DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS (*Capsicum annuum* L.) A
NEMATOIDES DAS GALHAS ACESSADA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR**

LAIS NÓBREGA RODRIGUES

AREIA – PB
JULHO – 2018

**RESISTÊNCIA DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS (*Capsicum annuum* L.) A
NEMATOIDES DAS GALHAS ACESSADA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR**

LAIS NÓBREGA RODRIGUES

**RESISTÊNCIA DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS (*Capsicum annuum* L.) A
NEMATOIDES DAS GALHAS ACESSADA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR**

Trabalho apresentado ao Curso de Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba em observância às exigências para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Mailson Monteiro do Rêgo, D.Sc.

**AREIA – PB
JULHO – 2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R696r Rodrigues, Lais Nóbrega.
Resistência de Pimenteiros Ornamentais (*Capsicum annum*
L.) a Nematoides das Galhas Acessada por Marcador
Molecular ISSR / Lais Nóbrega Rodrigues. - Areia, 2018.
34 f. : il.

Orientação: Mailson Monteiro do Rêgo.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. ISSR. 2. *Capsicum*. 3. nematoide das galhas. 4.
Meloidogyne. I. Rêgo, Mailson Monteiro do. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

LAIS NÓBREGA RODRIGUES

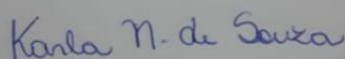
**RESISTÊNCIA DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS (*Capsicum annuum* L.) A
NEMATOIDES DAS GALHAS ACESSADA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR**

Trabalho de Graduação aprovado em: 13 / 07 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Mailson Monteiro do Rêgo, D.Sc.
CCA/UFPB
Orientador



Enga. Agrônoma Karla Nascimento de Souza
UFERSA
Examinadora



Profa. Elizanilda Ramalho do Rêgo, D.Sc.
CCA/UFPB
Examinadora

DEDICATÓRIA

*À Deus, que esteve sempre presente iluminando meu dia a dia.
Aos meus pais, Marisa e Eraldo (in memoriam), e às minhas irmãs, Larissa e Ana Luisa, os
quais foram sempre meu porto seguro.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente em minha vida, me guiando no dia a dia, mostrando os porquês da vida e me permitindo ter saúde e força para seguir firme.

À minha mãe, Marisa Nóbrega Rodrigues, por ser maravilhosa em todos os aspectos da minha vida, em especial nos estudos, sempre apoiando e incentivando. Ao meu pai, Eraldo Custódio Rodrigues (*in memoriam*), por todas as torcidas e ensinamentos que me foram passados, sendo o melhor pai do mundo. Com os dois aprendi que o amor é tudo.

Às minhas queridas irmãs, Larissa Nóbrega Rodrigues e Ana Luisa Nóbrega Rodrigues, por serem sempre companheiras e estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, dando conselhos e coragem.

Ao meu namorado, Lucas de Azevêdo Sales, por toda paciência, compreensão, carinho, dedicação, companheirismo e amor, sempre fazendo questão de estar ao meu lado, me ajudando e me apoiando durante todo o curso. Com ele toda dificuldade é amenizada e tudo parece ter solução.

Ao meu orientador, professor Mailson Monteiro do Rêgo, D.Sc., o qual tenho grande admiração como pessoa e profissional, pela disponibilidade de me acompanhar neste trabalho e por todo conhecimento que me foi transmitido, dando-me oportunidade para crescer profissionalmente.

À professora Elizanilda Ramalho do Rêgo, D.Sc., pela disponibilização de material para a realização deste trabalho e por toda atenção.

Ao professor Dr. Guilherme Silva de Podestá, por todo conhecimento passado na área de nematologia e pela disponibilização do laboratório.

À Karla Nascimento de Souza, por todos os dias que estive me acompanhando no laboratório, transmitindo seus conhecimentos com muita calma e paciência.

À Universidade Federal da Paraíba – UFPB, ao Departamento de Ciências Biológicas e ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pela acolhida e possibilidade de realização deste trabalho.

Aos professores do Centro de Ciências Agrárias por cada uma de suas contribuições na minha formação.

À minha família materna, em especial ao meu avô Sales, por estar sempre torcendo, além da preocupação em estar sempre passando informações do mundo da agronomia.

À minha família paterna, em especial à minha avó Edite, por todas sábias palavras de força e coragem e por todo apoio emocional dado.

Aos professores Drs. Alexandre Igor de Azevêdo Pereira e Carmen Rosa da Silva Curvêlo por terem sido tão receptivos e atenciosos em sua casa durante um mês para a realização de estágio, o qual se fez essencial para a escolha da área que quero seguir.

À professora Gleina Costa Silva Alaves, D.Sc., e ao pesquisador Júlio Carlos Polimeni de Mesquita, D.Sc., pela disponibilização de inóculos de nematoides.

À Osmar, por estar sempre apoiando e torcendo, e por toda dedicação dada à família.

À Hemmylly, Rafael, Thássylla, Itallo e Julianna pela amizade e por estarem sempre ao meu lado me dando conselhos e proporcionando momentos de muitas risadas e descontração.

Às minhas amigas Lizandra e Nathalia por toda palavra de força e apoio em vários momentos de minha vida.

Aos amigos e eternos vizinhos Renata, Thalles, Nailson e Ilda por todas as conversas e encontros no corredor, eles tornaram minha estadia em Areia muito mais agradável.

À David, Ingrid, Ulisses (*in memoriam*) e Jardel por terem sido grandes companheiros de curso e deixarem a rotina de aulas mais agradável.

Aos funcionários: Jacy, Jajá, Doda e Seu Pedro, por todo cuidado prestado, sem eles muitas coisas não teriam seguido em frente durante o curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Material vegetal	21
4.2 Extração do DNA.....	21
4.3 Purificação do DNA.....	22
4.4 Quantificação do DNA	22
4.5 ISSR-PCR	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcador de peso molecular de DNA Ladder de 1kb.	23
Figura 2. Produtos de amplificação de ISSR com o primer LA-4 em seis acessos de <i>Capsicum annuum</i> L.	24
Figura 3. Produtos de amplificação de ISSR com o primer LA-5 em dois acessos de <i>Capsicum annuum</i> L.	25
Figura 4. Produtos de amplificação de ISSR com o primer LA-7 em cinco acessos de <i>Capsicum annuum</i> L.	26
Figura 5. Produtos de amplificação de ISSR com o primer LA-8 em onze acessos de <i>Capsicum annuum</i> L.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e sequência dos primers utilizados com marcadores moleculares ISSR.....	23
Tabela 2. Possíveis indicativos de resistência de acessos de <i>Capsicum annuum</i> L. aos nematoides das galhas acessada por marcador molecular ISSR.....	25

RODRIGUES, Lais Nóbrega, Universidade Federal da Paraíba, Junho de 2018. **Resistência de Pimenteiros Ornamentais (*Capsicum annuum* L.) a Nematoides das Galhas Acessada por Marcador Molecular ISSR.** Orientador: Mailson Monteiro do Rêgo, D.Sc.

RESUMO

As pimenteiros pertencem ao gênero *Capsicum* e são apreciadas e cultivadas no mundo inteiro. O comércio de pimenteiros ornamentais vem crescendo devido sua grande diversidade relacionada com diversas características de interesse, tais como: porte pequeno, frutos coloridos e vistosos com diferentes cores durante o processo de maturação. Um dos problemas que atingem esta cultura e que causa prejuízos é o nematoide das galhas, cujo controle mais indicado é o uso de plantas resistentes. Diante disto, este trabalho objetivou avaliar a resistência de diferentes acessos de *Capsicum* a nematoides das galhas acessada por marcador molecular ISSR. Para tanto, DNA de folhas jovens dos acessos AC04, AC05, AC06, AC07, AC09, AC10, AC11, AC13, AC23, AC24, AC25, AC26, AC27, AC28, AC29 e AC30, foi extraído e realizado a amplificação por ISSR-PCR, utilizando 9 primers. Os produtos da reação de cada primer foram comparados com os marcadores específicos de resistência a nematoides das galhas reportados na literatura. Dentre os 16 acessos avaliados, observou-se possível resistência aos nematoides nos acessos AC05, AC07, AC09 e AC28. Os primers LA-7 e LA-8 possivelmente estão associados ao gene de resistência a nematoides em *Capsicum* N. Contudo, é necessário confirmar os resultados reportados neste trabalho com a inoculação de ovos de nematoides das diferentes espécies que atacam as pimenteiros.

Palavras-chaves: ISSR, *Capsicum*, nematoide das galhas, *Meloidogyne*.

RODRIGUES, Lais Nóbrega, Universidade Federal da Paraíba, Junho de 2018. **Resistance of Ornamental Peppers (*Capsicum annuum* L.) to Root-Knot Nematodes Accessed by ISSR Molecular Marker**. Orientador: Mailson Monteiro do Rêgo, D.Sc.

ABSTRACT

Peppers belong to the genus *Capsicum* and are appreciated and cultivated worldwide. The ornamental pepper trade has been growing due to its great diversity related to several characteristics of interest, such as: small size, colorful and showy fruits with different colors during the maturation process. One of the problems that reach this crop and that causes damages is the root-knot nematode, whose is control most indicated is the use of resistant plants. Therefore, this work aimed to evaluate the resistance of different accesses of *Capsicum* to root-knot nematodes under the use of the ISSR molecular marker. For the present study, DNA from young leaves of the accesses AC04, AC05, AC06, AC07, AC09, AC10, AC11, AC13, AC23, AC24, AC25, AC26, AC27, AC28, AC29 and AC30 was extracted and amplified by ISSR-PCR using 9 primers. The reaction products of each primer were compared with the specific markers of resistance to root-knot nematode reported in the literature. Among the 16 accesses evaluated, a possible resistance to root-knot nematode was observed in AC05, AC07, AC09 e AC28 accesses. The primers LA-7 e LA-8 are possibly associated with N nematode resistance gene. However, it is necessary to confirm the results reported in this work with the inoculation of nematode eggs of different species that attack peppers.

Key words: ISSR, *Capsicum*, root-knot nematode, *Meloidogyne*.

1. INTRODUÇÃO

Originadas no continente americano, as espécies de pimenteiras do gênero *Capsicum* fazem parte da família Solanaceae. As pimenteiras são apreciadas e cultivadas no mundo inteiro, graças às suas características de pungência, aroma e enorme variedade de tipos, cores e formatos (MELO et al., 2014). No Brasil, destaca-se a região Nordeste como maior consumidora de pimentas (RIBEIRO & CRUZ, 2002), cujo cultivo é feito principalmente por um grande número de pequenos agricultores (PINHEIRO et al., 2012).

Quatro espécies de *Capsicum* são domesticadas e largamente cultivadas: *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L. e *Capsicum baccatum* L. (PINHEIRO et al., 2012). Dentre estas, a espécie que mais se destaca por ser a mais cultivada é a *Capsicum annuum* L. (REIFSCHNEIDER, 2000). São plantas herbáceas cuja altura varia a depender da espécie e condições de cultivo (SANTOS, 2008).

A produção de pimenteira é muito variável, não podendo ser estimada com exatidão, uma vez que seu cultivo se dá por meio de um grande número de pequenos produtores e por ser apresentada em conjunto com pimentão (PINHEIRO et al., 2012; MELO et al., 2014). Esta cultura trás consigo uma grande importância socioeconômica, pois influencia na estrutura familiar destes pequenos produtores (MACEDO, 2015).

A produção de pimenteiras está relacionada a dois mercados principais, o comércio *in natura* e o processamento. No comércio *in natura* está inserida a produção de pimenteiras para fins ornamentais (MELO et al., 2014), a qual vem crescendo no mercado de plantas ornamentais devido sua grande diversidade relacionada com diversas características, tais como: porte pequeno, frutos coloridos e vistosos com diferentes cores no processo de maturação (RÊGO et al., 2009; BIANCHETTI, 1996; UPNMOOR, 2003; SANTOS, 2008), e também por ser de fácil cultivo e apresentar grande durabilidade (NEITZKE et al., 2010).

As características das pimenteiras são variáveis, mas geralmente apresentam uma flor por nó cuja corola é branca, anteras azuladas, hastes e folhas com tamanho, coloração, formato e pilosidade variáveis entre e dentro das espécies, frutos de várias cores e formatos, geralmente pendentes, persistentes e com polpa firme, as sementes se apresentam em cor de palha (SANTOS, 2008; MELO et al., 2014). Apresentam fácil propagação por meio de sementes, com tempo de germinação relativamente curto, e possuem tolerância ao calor (SEGATTO, 2007; STOMMEL & BOSLAND, 2007).

Diversos são os fatores que podem causar prejuízos à produção de *Capsicum*, dentre estes, o nematoide das galhas (PINHEIRO, 2017), têm causado os maiores prejuízos. O

nematoide das galhas pertence ao gênero *Meloidogyne* e causa sintomas que pode acarretar em danos econômicos (MITKOWSKI & ABAWI, 2003). A infecção deste fitoparasita ocorre no momento em que este introduz seu aparelho bucal na parede celular da raiz (CAMPOS et al., 2001). Assim, haverá a formação de galhas em todo o sistema radicular das plantas, reduzindo a produção e a qualidade comercial, uma vez que o sistema radicular é afetado e o transporte de água e nutrientes é prejudicado. Além de sintomas no sistema radicular, a formação de galhas, outros sintomas também podem ser observados na parte aérea das plantas, como nanismo, murcha e clorose (PINHEIRO et al., 2012). Quando os níveis populacionais são intensificados, surgem sintomas como aprofundamento e redução das raízes secundárias. Tem-se, na parte aérea, a desfolha, murcha e morte da planta (PINHEIRO, 2017).

No Brasil, as espécies de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* são responsáveis pelos maiores prejuízos causados às pimenteiras, mais especificamente as do gênero *Capsicum*. As espécies de maior importância são *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, e *Meloidogyne enterolobii* (CARNEIRO et al., 2006; McSORLEY & THOMAS, 2003).

Existem diversos métodos de controle das populações de nematoides no solo, sendo o controle químico, nematicidas, o normalmente utilizado (FAZARI et al., 2012), cujo uso deixa resíduos tóxicos e polui o meio ambiente. Porém, o mais indicado é a utilização de plantas com resistência genética, pois se trata da medida de controle aos fitonematoides mais eficiente e econômica, evitando que estes causem problemas de forma intensificada e promovendo pouca ou nenhuma alteração nas práticas de manejo convencionais (PINHEIRO, 2017).

De acordo com Santos (2008), é necessário o aprofundamento no estudo da diversidade de *Capsicum* e de seu potencial como fonte de resistência aos nematóides para subsidiar os programas de melhoramento do gênero. Assim, torna-se claro que além de apresentar importância na produção de plantas ornamentais com características em relação ao tamanho, precocidade, qualidade dos frutos, capacidade e longevidade do valor ornamental (RÊGO et al., 2011a; FINGER et al., 2012), o melhoramento genético também tem importante atuação na seleção de cultivares resistentes a pragas, doenças, estresses bióticos e abióticos (STOMMEL & BOSLAND, 2007).

Em programas de melhoramento é fundamental que haja a caracterização precisa das plantas, e a forma mais confiável de se obter tais características é através dos marcadores moleculares (BORÉM, 2005), pois estes tornam possível o conhecimento do germoplasma

disponível para que futuramente haja uma seleção de genótipos confiável (BLANK et al., 2004). Além da maior confiabilidade, os marcadores moleculares permitem selecionar precocemente os genótipos, diminuindo os custos com manutenção e não são influenciados pelo ambiente (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001). A técnica de Sequências Simples Repetitivas Internas (ISSR) apresenta elevado grau de polimorfismo, de fácil execução e baixo custo (BORBA et al., 2005).

Diante da necessidade de estudos mais aprofundados quanto ao potencial de *Capsicum* spp. como fonte de resistência aos nematoides das galhas, este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de diferentes genótipos de *Capsicum* a nematoides das galhas (*M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* raças 1 e 2) por meio de marcador molecular ISSR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pimenteiras do gênero *Capsicum*

As pimenteiras do gênero *Capsicum*, pertencem à família Solanaceae e são originárias do continente americano. Suas formas silvestres ocorrem desde o sul dos Estados Unidos até o norte do Chile (FILGUEIRA, 2005). No Brasil, o Nordeste se destaca como região que apresenta maior consumo de pimentas (RIBEIRO & CRUZ, 2002), tendo um grande número de pequenos produtores responsáveis pelo cultivo (PINHEIRO et al., 2012). Devido à sua grande variedade, as pimenteiras são consideradas como parte valiosa do patrimônio genético da biodiversidade brasileira (NASCIMENTO et al., 2011; CARVALHO et al., 2006).

As plantas de pimenteiras do gênero *Capsicum* são arbustivas com ampla ramificação lateral, apresentando altura variável a depender da espécie e das condições de manejo. Geralmente apresentam uma flor por nó cuja corola é branca, anteras azuladas, hastes e folhas com tamanho, coloração, formato e pilosidade variáveis entre e dentro das espécies, frutos de várias cores e formatos, geralmente pendentes, persistentes e com polpa firme, as sementes se apresentam em cor de palha (SANTOS, 2008; MELO et al., 2014). Os frutos são classificados como baga, havendo numerosas sementes, são bastante variáveis quanto ao formato, tamanho, posição na planta, cor e pungência (CARVALHO et al., 2006). Apresentam fácil propagação por meio de sementes, com tempo de germinação relativamente curto, e possuem tolerância ao calor (SEGATTO, 2007; STOMMEL & BOSLAND, 2007).

O gênero *Capsicum* possui aproximadamente vinte espécies, sendo que as domesticadas e largamente cultivadas no Brasil são: *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L. e *Capsicum baccatum* L. (PINHEIRO et al., 2012; CARVALHO et al., 2006). Dentre estas, a espécie que mais se destaca por ser a mais cultivada é a *Capsicum annuum* L. (REIFSCHNEIDER, 2000), a qual inclui os tipos mais comuns de pimentas deste gênero, inclusive as pimentas ornamentais, e que possui maior área cultivada no mundo (CARVALHO et al., 2006).

Uma vez que o cultivo de pimenteiras se dá por meio de um grande número de pequenos produtores e por ser apresentada em conjunto com o pimentão, a produção de pimenta é muito variável (PINHEIRO et al., 2012; MELO et al., 2014), não havendo uma estimativa dada com exatidão. A produção de pimentas trás consigo grande importância socioeconômica, uma vez que influencia na estrutura familiar dos pequenos produtores, tornando este cultivo como principal fonte de renda ou uma alternativa para sua complementação (MACEDO, 2015; PINHEIRO et al., 2012).

O cultivo de pimenteiras é caracterizado por ser muito amplo e promissor, uma vez que se tem a integração entre produção e o processamento e pela grande diversidade de uso. A produção de pimentas faz parte de um importante segmento do mercado agrícola brasileiro, se destacando na produção destinada a dois mercados principais: o comércio *in natura* e o processamento (CARVALHO et al., 2006; MELO et al., 2014).

No comércio *in natura* está inserida a produção de pimenteiras para fins ornamentais (MELO et al., 2014), a qual vem crescendo no mercado de plantas ornamentais devido sua grande diversidade relacionada com diversas características, tais como: porte pequeno, frutos coloridos e vistosos com diferentes cores no processo de maturação (RÊGO et al., 2009; BIANCHETTI, 1996; UPNMOOR, 2003; SANTOS, 2008), e também por ser de fácil cultivo e apresentar grande durabilidade (NEITZKE et al., 2010).

Determinadas pimenteiras são capazes de se desenvolverem em vasos como planta perene, agregando valor, uma vez que se tornam valorizadas no mercado de plantas ornamentais. Por meio da valorização das pimenteiras, tem-se a geração de novos empregos e a fixação dos pequenos produtores e suas famílias no campo, já que são os principais responsáveis pela expansão da área cultivada de pimenteiras no Brasil (FINGER et al., 2012; RÊGO et al., 2012; FABRI, 2008).

A produção de pimenteiras do gênero *Capsicum* pode ser acometida por diversas doenças, as quais apresentam diferentes graus de prejuízos a depender da época de plantio, do estado nutricional e da variedade da pimenteira cultivada (SANTOS, 2008). As principais doenças que atingem as pimenteiras são causadas por bactérias, fungos, nematoides e vírus (LOPES et al., 2011). Os maiores prejuízos dados na cultura de pimenteiras e pimentões são atribuídos aos nematoides das galhas (PINHEIRO, 2017).

2.2 Nematoides das galhas em *Capsicum*

Nematoides são organismos que podem ser encontrados no solo, de corpo alongado e cilíndrico ou, em algumas fêmeas, corpo arredondado. Podem ser de vida livre, os quais não apresentam prejuízo às plantas, ou fitonematoides, causando prejuízos por meio da destruição do sistema radicular da planta. Alguns dos mais conhecidos são os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.), os quais apresentam sintomas significativos que causam danos econômicos (MITKOWSKI & ABAWI, 2003).

O gênero *Meloidogyne* corresponde a um dos principais problemas fitossanitários em hortaliças nos trópicos (SIKORA & FERNANDEZ, 2005), incluindo, principalmente,

hortaliças da família Solanaceae (PINHEIRO et al., 2012). Já foram descritas mais de 100 espécies de nematoide das galhas (KARSSSEN, 2013). Em situações de alta população de nematoides, torna-se economicamente inviável o cultivo de hortaliças, a exemplo da pimenteira (McSORLEY & THOMAS, 2003). No Brasil, as espécies de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* são responsáveis pelos maiores prejuízos causados às pimenteiras, mais especificamente as do gênero *Capsicum*. As espécies de maior importância são *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, e *Meloidogyne enterolobii* (CARNEIRO et al., 2006; McSORLEY & THOMAS, 2003).

O estágio infectante do nematoide das galhas é o juvenil de segundo estágio (J2), o qual tem vida móvel no solo (PINHEIRO, 2017). A infecção deste fitoparasita ocorre no momento em que este introduz seu aparelho bucal na parede celular da raiz (CAMPOS et al., 2001). Ao alcançarem os vasos condutores, os juvenis se desenvolverão, e, em resposta à introdução de substâncias esofagianas nos tecidos das raízes da planta, haverá o aumento no tamanho e no número de células das raízes parasitadas, formando, assim, as galhas. Em pimentas estas galhas são geralmente menores do que as galhas que são formadas em tomateiro e pimentão (PINHEIRO, 2017).

Assim, com a formação de galhas em todo o sistema radicular das plantas, haverá redução da produção e da qualidade comercial, uma vez que o sistema radicular é afetado e o transporte de água e nutrientes é prejudicado. Além de sintomas no sistema radicular, a formação de galhas, outros sintomas também podem ser observados na parte aérea das plantas, como nanismo, murcha e clorose (PINHEIRO et al., 2012). Quando os níveis populacionais são intensificados, surgem sintomas como apodrecimento e redução das raízes secundárias. Tem-se, na parte aérea, a desfolha, murcha e morte da planta (PINHEIRO, 2017).

Os nematoides das galhas são fitonematoides endoparasitas obrigatórios (CARNEIRO, 2014), os quais infectam plantas suscetíveis em condições de temperatura e umidade favoráveis. Em locais de clima quente e solos úmidos os nematoides das galhas estão em atividade durante o ano todo. Sua disseminação ocorre principalmente de forma passiva, uma vez que sua movimentação no solo ocorre lentamente, alcançando poucos centímetros de distância. Portanto, é através da movimentação do solo, da água, de implementos agrícolas contaminados, do homem e animais nas áreas de cultivo e por meio de mudas contaminadas que se dá a disseminação de nematoides (PINHEIRO, 2017).

Existem diversos métodos de controle das populações de nematoides no solo, sendo o controle químico, nematicidas, o normalmente utilizado (FAZARI et al., 2012), o qual deixa

resíduos tóxicos e polui o meio ambiente. Métodos preventivos são indicados para o controle, o qual reduz ou mantém as densidades populacionais dos nematoides evitando danos econômicos. A prevenção é feita por meio do uso de mudas livres de nematoides, plantio em épocas mais secas e frias, desinfestação de máquinas e implementos agrícolas, rotação de culturas, entre outros (PINHEIRO et al., 2012). Embora existam diversos métodos de controle, a utilização de plantas com resistência genética é a mais indicada, pois se trata da medida de controle aos fitonematoides mais eficiente, econômica e não poluente, evitando que estes causem problemas de forma intensificada, além de promoverem pequena ou nenhuma alteração nas práticas de manejo convencionais (PINHEIRO, 2017).

2.3 Melhoramento de Pimenteiras

Os primeiros a praticarem melhoramento em pimenteiras do gênero *Capsicum* foram os povos indígenas das Américas por meio da seleção. São plantas autógamas, diploides e apresentam, geralmente, 24 cromossomos ($2n=2x=24$). Os métodos de melhoramento utilizados em pimenteiras envolvem, normalmente, hibridação, cujos genitores devem ser escolhidos de forma crítica, havendo necessidade de se conhecer as características de interesse (RÊGO et al., 2011b).

É evidente que grandes prejuízos são causados por pragas e doenças em produções agrícolas. Assim, torna-se essencial a valorização do uso de cultivares resistentes, uma vez que trarão não só redução no custo de produção, mas também a diminuição do impacto ambiental causado pela agricultura (RAMALHO & REIS, 2013).

Diante da necessidade de se selecionar possíveis genitores em um programa de melhoramento, existe a possibilidade de análise do DNA de plantas por meio de marcadores moleculares, os quais acessam o genoma sem influência das condições ambientais e, conseqüentemente, erros de identificação (BORBA et al., 2005), além de auxiliar o melhorista na escolha do genitor com característica desejada de forma mais rápida (RAMALHO & REIS, 2013).

Os marcadores moleculares permitem identificar a presença de sequências nucleotídicas específicas no genoma de uma espécie, de forma que auxilia na escolha de genitores, na identificação de genótipos, na conservação do germoplasma, em métodos de melhoramento como o retrocruzamento e na seleção assistida (VIEIRA, 2015). A seleção assistida por marcadores só é possível após a identificação de marcadores fortemente ligados aos genes que controlam as características de interesse (PEREIRA, 2006).

Vários genes que conferem diferentes graus de resistência a nematoides já foram descritos em hortaliças, podendo um mesmo gene conferir resistência a mais de uma espécie de nematoide. Os genes *N* e *Me*, apresentam resistência a nematoides em *C. annuum* (CASTAGNONE-SERENO et al., 2001; HARE, 1956; HENDY et al., 1985; FERY & DUKES, 1996) e, o gene *Mi*, em tomateiro, confere resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (COOK, 1991).

O uso de marcadores moleculares para a seleção de genótipos resistentes a nematoides apresenta a vantagem de não ser afetada pelas condições ambientais (TATINENI et al., 1996), além de que permite selecionar precocemente os genótipos, diminuindo os custos com a manutenção da população de nematoides, a multiplicação, a inoculação de plantas e morte das plantas (FUGANTI et al., 2004).

Os marcadores de Sequências Simples Repetitivas Internas (ISSR) é um importante marcador molecular, pois apresenta elevado grau de polimorfismo, de fácil execução e baixo custo (BORBA et al., 2005). Esta técnica é baseada em PCR, a qual não necessita do conhecimento prévio do genoma e utiliza apenas um primer, diferentemente da técnica Sequências Simples Repetidas (SSR), a qual utiliza dois primers loco-específicos (COSTA, 2010).

De acordo com Santos (2008) é necessário o aprofundamento no estudo da diversidade de *Capsicum* e de seu potencial como fonte de resistência aos nematoides para subsidiar os programas de melhoramento do gênero.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a resistência de diferentes genótipos de *Capsicum* a nematoides das galhas (*M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* raças 1 e 2) acessada por marcador molecular ISSR;
- Identificar marcadores moleculares associados ao gene N, resistente a nematoides em *Capsicum*; e
- Indicar genótipos resistentes a nematoides das galhas, para serem introduzidos no programa de melhoramento de pimenteiros ornamentais do CCA/UFPB.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal usado neste estudo compreende os acessos de pimenteiras ornamentais de *Capsicum* sp (AC04, AC05, AC06, AC07, AC09, AC10, AC11, AC 13, AC23, AC24, AC25, AC26, AC27, AC28, AC29 e AC30, e pertence ao Banco de Germoplasma do Programa de Melhoramento de Pimenteiras Ornamentais do CCA/UFPB.

As sementes foram postas para germinar em bandejas de isopor de 180 células, semeando-se três sementes por célula. A semeadura foi realizada em 27 de abril de 2018, e em 19 de junho do mesmo ano foram coletadas as folhas e armazenadas em freezer com as devidas identificações para posterior extração do DNA.

4.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi baseada no método descrito por Doyle e Doyle (1990). Utilizou-se 200 mg de folhas, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo, até a obtenção de um pó fino; transferiu-se esse material para microtubos Eppendorf de 1,5 mL onde foi adicionado 700 µL de tampão de extração (CTAB 2%; β-mercaptoetanol), sendo os microtubos agitados lentamente por 1 minuto até que a solução se tornasse viscosa. As amostras foram submetidas à banho-maria (60 °C por 30 minutos) para solubilização e homogeneização da suspensão; em seguida, foi acrescentado 600 µL de CIA (Clorofórmio:Ácool isoamílico)(24:1), agitou-se lentamente durante 1 minuto e centrifugou-se à 13.400 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante (600 µL) foi transferido para um novo microtubo Eppendorf; e então foi adicionado 600 µL de CIA agitando bem e centrifugando a 13,400 rpm por 5 minutos. Cerca de 400 µL da parte superior foi transferida para novo microtubo e 40 µL do volume do tampão de lavagem foi adicionado, sendo os microtubos agitados por inversão durante 5 minutos. Acrescentou-se 500 µL de CIA, agitou-se e centrifugou-se à 13.400 rpm por mais 5 minutos; transferiu-se 280 µL da fase superior para um novo microtubo e foi adicionado 185 µL de isopropanol frio, em seguida foram centrifugados à 13.400 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol 70% e centrifugou-se à 13.400 rpm à 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto (95%) e centrifugou-se à 13.400 rpm por 2 minutos. O excesso de etanol foi descartado e deixou-se secar à temperatura ambiente para a total evaporação do etanol. Ressuspendeu-se o pellet em 50 µL de tampão TE e armazenados a -20 °C.

4.3 Purificação do DNA

As amostras de DNA genômico dos indivíduos de *C. annuum* foram incubadas em banho-maria à 37 °C, com concentração de DNA na proporção de 1:1/2 RNase (40 ng/mL) (v:v), durante 12 minutos. Adicionou-se 1:10 de NaCl 5M seguido de 2/3 do volumes de isopropanol gelado, sendo as amostras mantidas a -20 °C por 2 horas. Logo após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 13400 rpm. O sobrenadante foi removido e os microtubos lavados duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%, passando pela centrífuga à 13400 rpm por 2 minutos a cada lavagem. Em seguida, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e os microtubos mantidos à temperatura ambiente para total evaporação do etanol; o precipitado foi ressuspenso em 40 µL de tampão TE.

4.4 Quantificação do DNA

O material extraído foi submetido ao processo de eletroforese em gel de agarose 0,8% para estimar a quantidade e integridade do DNA. Alíquotas de cada amostra de DNA foram aplicadas nos poços do gel e a concentração das amostras foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas de DNA, com a do padrão conhecido. A corrida foi realizada em tampão TAE 1x (Tris-acetato 0,04 M e EDTA 2 mM), a 100 volts e o gel, corado com brometo de etídio, foi fotografado sob luz UV, em um fotodocumentador tipo Gel Logic 112.

4.5 ISSR-PCR

As reações de amplificação do DNA foram feitas utilizando-se um volume final de 25 µL, sendo 23 µL de Mix (2,5 µL de tampão 1x + 1,5 µL de MgCl₂ + 0,5 µL de dNTP + 2,5 de primer + 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1 U + 15,8 µL de água) e 2 µL de DNA genômico (50 ng) da amostra.

Para a obtenção das marcas de ISSR foram utilizados 9 primers, cujas sequências são mostradas na Tabela 1. Estas sequências foram selecionadas como potencialmente úteis no estudo de Refaat & Elgarhy (2007), e também no trabalho de Elgarhy & Refaat (2008) para estudar a resistência a nematoides das galhas em pimentões (*C. annuum* L.).

Tabela 1. Identificação e sequência dos primers utilizados com marcadores moleculares ISSR.

Primer	Sequência de nucleotídeos 5'-3'
LA-1	(CT)8TG
LA-2	(CT)8AC
LA-3	(CT)8GC
LA-4	(CA)6AC
LA-5	(CA)6AG
LA-6	(GT)6GG
LA-7	(GT)6CC
LA-8	(CAC)3GC
LA-9	(GAG)3GC

As reações de amplificação foram efetuadas em um termociclador Techne Plus com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído por: 30 segundos à 94 °C, 45 segundos à 40 °C e 1 minutos à 72 °C; após os 35 ciclos, foi realizada a extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese, em cuba horizontal, contendo tampão TBE 0,5 X, por um período de uma hora, em gel de agarose 1,5% a 100 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz UV, no fotodocumentador Gel Logic 112. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados por comparação com marcador de DNA de 1 kb Ladder, cujos tamanhos das bandas estão detalhados na Figura 1.

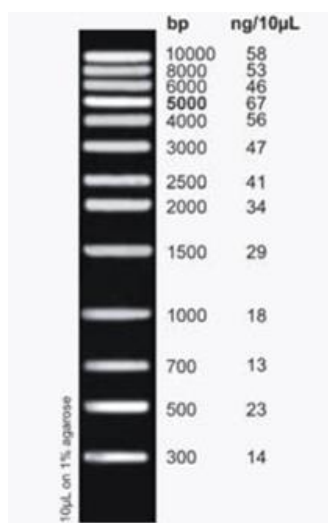


Figura 1. Marcador de peso molecular de DNA Ladder de 1kb.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação dos 9 primers e de ISSR, observou-se que apenas um não gerou produtos de amplificação (LA-2), possivelmente por problemas no primer.

Os produtos de PCR dos primers LA-1, LA-3 e LA-9 não geraram marcadores específicos para resistência, considerando-se, portanto, que estes primers não se adequam para a realização de um estudo de resistência a nematoides das galhas nos acessos em questão. O primer LA-6 não produziu fragmentos com nitidez, havendo a necessidade de repetir o preparo do gel e analisar as bandas futuramente. Elgarhy & Refaat (2008), correlacionaram a resistência a nematoides das galhas por meio de marcador molecular e análise de índice de galhas, pôde-se encontrar os marcadores específicos positivos (resistência e alta resistência) e negativos para resistência (suscetível e altamente suscetível).

As análises do primer LA-4 estão ilustrados na Figura 2, e na Tabela 2. Este primer produziu um marcador específico negativo (seta amarela), que foi encontrado nos acessos AC10, AC13, AC23, AC24, AC25 e AC30 com peso molecular de 658,27 pb, o qual está ligado à alta suscetibilidade aos nematoides das galhas.

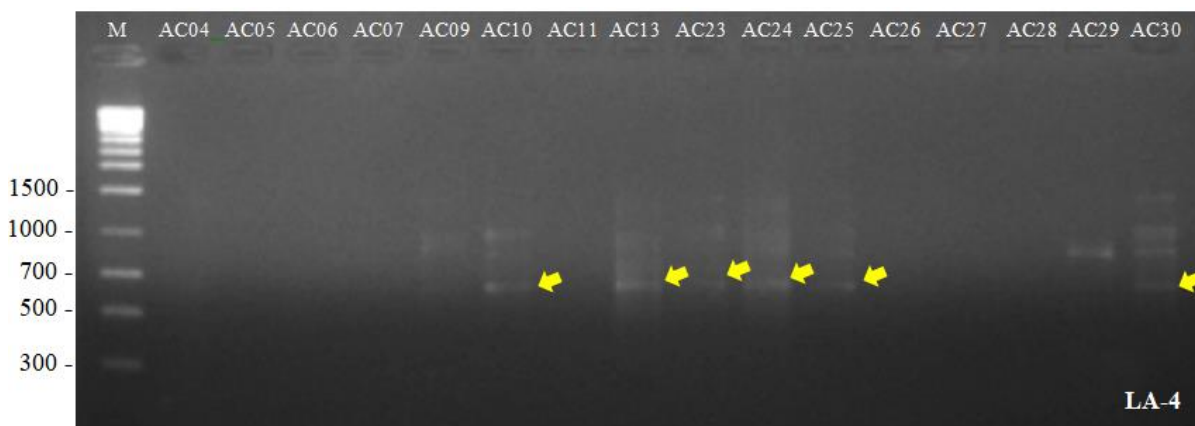


Figura 2. Produtos de amplificação de ISSR com o primer LA-4 em seis acessos de *Capsicum annuum* L.

Tabela 2. Possíveis indicativos de resistência de acessos de *Capsicum annuum* L. aos nematoides das galhas acessada por marcador molecular ISSR.

Primers ISSR	Peso Molecular (bp)	Resistência	Acessos
LA-4	658,27	Altamente Suscetível	AC10*; AC13; AC23; AC24; AC25; AC30
LA-5	429,60	Altamente Suscetível	AC29; AC30
LA-7	368,56	Alta Resistência	AC05; AC07; AC09
	553,66	Suscetível	AC06; AC29
LA-8	771,44	Alta Resistência	AC07; AC09
	918,79	Alta Resistência	AC10*; AC28

O primer LA-5 produziu marcadores específicos de 429,60 pb nos acessos AC29 e AC30 como ilustrado na Figura 3 e na Tabela 2, ligado à alta suscetibilidades aos nematoides das galhas. A presença do marcador específico de alta suscetibilidade no indivíduo AC30 neste primer (LA-5) corrobora com o encontrado no primer LA-4, também de alta suscetibilidade.

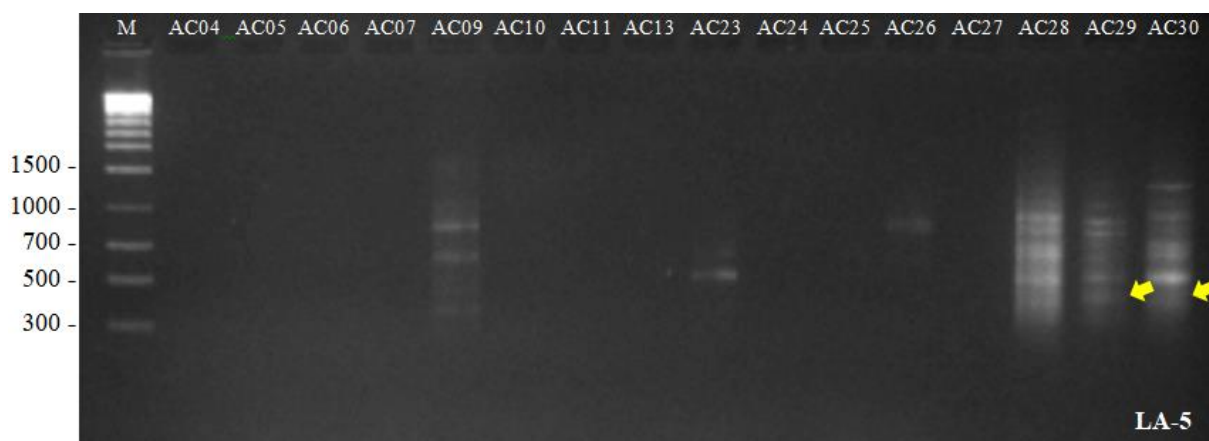


Figura 3. Produtos de amplificação de ISSR com o primer LA-5 em dois acessos de *Capsicum annuum* L.

Os produtos de PCR do primer LA-7 estão ilustrados na Figura 4, e na Tabela 2. Este primer gerou dois marcadores específicos, um de 368,56 pb nos acessos AC05, AC07 e AC09 que está ligado à alta resistência aos nematoides das galhas, e outra de 553,66 pb nos acessos AC06 e AC29, o qual está ligado à suscetibilidade aos nematoides das galhas. Neste primer, o marcador específico de 553,66 pb no indivíduo AC29 condiz com o que foi encontrado no primer LA-5, ambos relacionados à suscetibilidade.

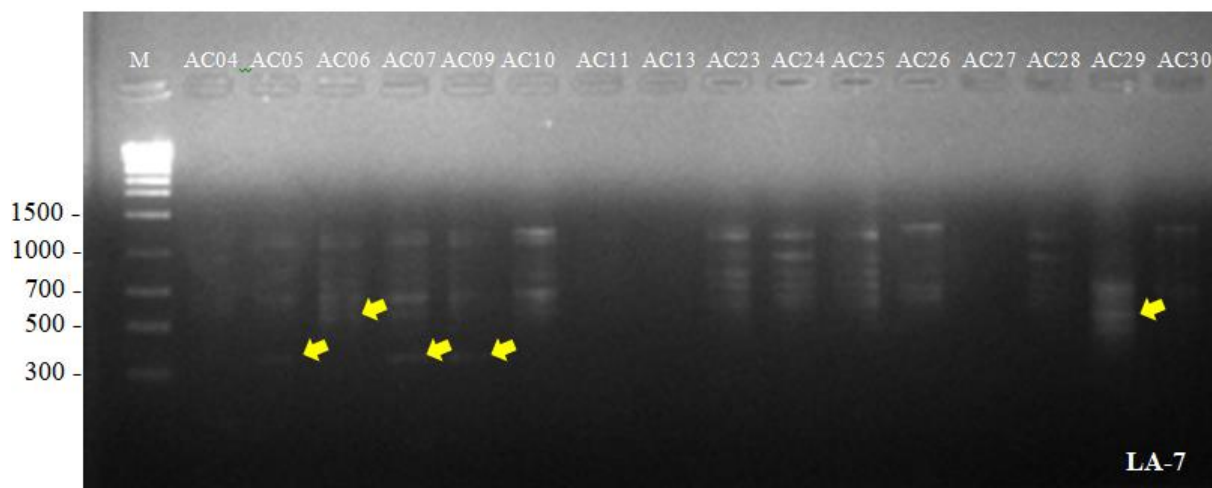


Figura 4. Produtos de amplificação de ISSR com o primer LA-7 em cinco acessos de *Capsicum annuum* L.

O primer LA-8 produziu dois marcadores específicos positivos de alta resistência, com 771,44 pb nos acessos AC07 e AC09, e 918,79 pb nos acessos AC10 e AC28, os quais podem ser observados na Figura 5 e na Tabela 2. Assim, diante de uma futura confirmação por meio da inoculação de nematoides nos acessos e avaliação da reação das plantas, pode-se selecionar o primer LA-8 como possível marcador de resistência aos nematoides das galhas. Outra banda em torno de 500 pb encontrada nos acessos AC04, AC06, AC07, AC09, AC10, AC11, AC 23, AC24, AC25, AC28 e AC30 (Figura 5) menos específica deve ser melhor investigada, pois engloba acessos suscetível para outros primers, e desse modo, evidencia que a resistência ao nematoide seria controlada por mais de um gene. Elgarhy & Refaat (2008) reportaram a existência de até cinco bandas marcadoras específicas para plantas altamente resistentes ao nematoide em *Capsicum*.

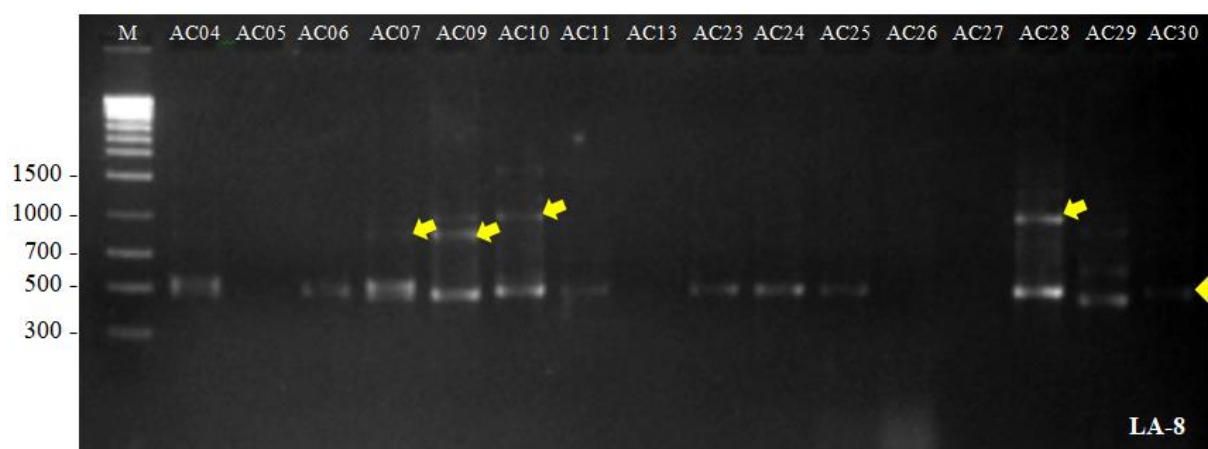


Figura 5. Produtos de amplificação de ISSR com o primer LA-8 em onze acessos de *Capsicum annuum* L.

O marcador específico de 771,44 pb associado à alta resistência observado no primer LA-8 nos acessos AC07 e AC09 corrobora com o que foi encontrado no primer LA-7 (368,56pb). Já o marcador específico associado à alta resistência, de 918,79 pb, encontrado para o acesso AC10 no primer LA-8, há conflito com o marcador específico de 658,27 pb observado no primer LA-4, associado à alta suscetibilidade. Sugerindo, portanto, que há a necessidade de comprovação futura em estudo da reação de plantas ao nematoide das galhas.

A ocorrência de marcadores específicos positivos e negativos em um mesmo indivíduo é suportada, possivelmente porque esta marca não está relacionada ao gene em estudo de um dos primers, sendo fundamental um futuro estudo por meio da inoculação dos acessos e avaliação da reação das plantas aos nematoides das galhas para dirimir as dúvidas da consistência da marca com a resistência gênica ao nematoide das galhas.

Alguns acessos apresentaram diferentes marcadores específicos, como é possível observar na Tabela 2, tornando claro que há a necessidade de se confirmar por meio da correlação entre as reações dos acessos e esses marcadores específicos que foram produzidos.

O marcador molecular ISSR resulta em produtos de amplificação, assim como visto por Kumar et al. (2001) ao caracterizar pimentões. O estudo por meio do marcador molecular é uma técnica que tem sido bastante utilizada tanto para quantificar variações genéticas como para associar características relacionadas à resistência das plantas a patógenos, como constatado por Adetula (2006).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

A possível resistência ao nematoide das galhas foi observada nos acessos AC 05, AC07, AC09 e AC29, podendo serem inseridos no programa de melhoramento.

Os primers LA-7 e LA-8 são os possíveis marcadores associados à resistência ao nematoide das galhas. Contudo, observa-se que há a necessidade de um futuro estudo com a inoculação dos acessos para confirmação dos resultados encontrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADETULA, O. A. **Genetic diversity of *Capsicum* using Random Amplified Polymorphic DNAs**. African Journal of Biotechnology, 5: 120-122, 2006.
- BIANCHETTI, L.B. **Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes no Brasil**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 1996.
- BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SANTOS NETO, A. L.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C. **Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca**. Horticultura Brasileira 22: 113-116. 2004.
- BORBA, R. DE S.; GARCIA A, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. **Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR**. Neotropical Entomology, Londrina. Vol. 34, p. 565-569, 2005.
- BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 969p, 2005.
- CAMPOS, V. P.; CAMPOS, J. R.; SILVA, L. H. C. P.; DUTRA, M. R. Manejo de nematoides em hortaliças. In: SILVA, L. H. C. P. da; CAMPOS, J. R. (Ed.); NOJOSA, G. B. de A. **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, p.125-158, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; BRAGA, R. S.; ALMEIDA, C. A.; GIORIA, R. **Primeiro registro de *Meloidogyne enterolobii* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à Meloidoginose no estado de São Paulo**. Nematologia Brasileira, 30 (1): 81-86. 2006.
- CARNEIRO, M. D. G. **Hospedabilidade de hortaliças a *Meloidogyne ethipica*: sugestão de manejo através de rotação de culturas**. Brasília, DF: UNB, 51 p., 2014.
- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. **Pimentas do Gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2006.

CASTAGNONE-SERENO, P.; BONGIOVANNI, M.; DHIAN-CAPORALINO, C. **New data on the specificity of the root-knot nematode resistance gene Me1 and Me3.** Plant Breeding, 120: 429-233, 2001.

COOK, R. **Resistance in plants to cyst and root-knot nematodes.** Agricultural Zoology Reviews, v.4, p. 213-240, 1991.

COSTA, J. C. **Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares.** Recife, PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

ELGARHY, H. A. S.; REFAAT, M. H. **Molecular tagging and inheritance of the root-knot nematode resistance in pepper.** Egypt. J. Genet. Cytol., 37: 223-237, Julho, 2008.

FABRI, E. G. **Pimenta.** Revista Globo Rural, nº 270, Editora Globo, Abril 2008.

FAZARI, A.; PALLOIX, A.; WANG, L. H.; HUA, M. Y.; SAGE-PALLOIX, A. M.; ZHANG, B. X.; DIJAN-CAPORALINO, C. **The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the Me-gene cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome.** Plant Breeding. 131: 665-673, 2012.

FERY, R. L.; DUKES, P. D. **The inheritance of resistance to the southern root -knot nematode in Carolina Hot and Cayenne pepper.** J. Amer. Soc. Hort. Sci., 121: 1024-102, 1996.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura.** 2 ed. Viçosa: UFV, 420 p., 2005.

FINGER, F. L.; RÊGO, E. R.; SEGATTO, F. B.; NASCIMENTO, N. F. F.; RÊGO, M. M. **Produção e potencial de mercado para pimenta ornamental.** Informe Agropecuário, 33:14-20. 2012.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. **Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistente a *Meloidogyne javanica*.** Nematologia Brasileira, vol. 4, 28(2): 125-130. 2004.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. **Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers.** Euphytica 122: 81-89. 2001.

HARE, W. W. **Resistances in pepper to *Meloidogyne incognita* acrita.** Phytopathology, 46: 98104, 1956.

HENDY, H.; POCHARD, E.; DALMASSO, A. **Inheritance of resistance to meliodogyne chitwood (Tylenchida) in 2 lines of *Capsicum annuum* L. study of homozygous progenies obtained by androgenesis.** Agronomie, 5: 93-100., 1985.

KARSSSEN, G.; WESEMAEL, W.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Ed.). **Plant Nematology.** 2nd ed. Wallingford: CABI, p. 73-18, 2013.

KUMAR, D. L.; KATHIRVEL, M.; RAO, G. V.; NAGARAJU, J. **DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annuum* L.) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays.** Forensic Science International, 116: 63-68, 2001.

LOPES, C. A.; HENZ, G. P.; REIS, A. Doenças das Pimentas e seu Controle. In: RÊGO, E. R.; FINGER, F. L.; RÊGO, M. M. (Org.). **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp.).** Areia, PB: Universidade Federal da Paraíba, 223 p., 2011.

MACEDO, A. **Pimentas *Capsicum*: uma história de sucesso na cadeia produtiva de hortaliças.** Brasília – DF, ano IV, n. 18, p. 9, out.-dez. 2015.

McSORLEY, R.; THOMAS, S. H. Diseases Caused by Nematodes. In: **Compendium of Pepper Diseases.** The American Phytopathological Society, USA, p.46-49, 2003.

MELO, A. M. T.; NASCIMENTO, W. M.; FREITAS, R. A. Produção de Sementes de Pimenta. In: NASCIMENTO, W. N. (Ed.). **Produção de Sementes de Hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa, 2014.

MITKOWSKI, N. A.; ABAWI, G. S. **Root-knot nematodes**. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0917-01. 2003.

NASCIMENTO, M. F.; RÊGO, E. R.; RÊGO, M. M.; NASCIMENTO, N. F. F.; ARAÚJO, E. R. **Vigor e germinação de sementes híbridas de pimenteiros ornamentais**. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v. 17, nº 1, p. 51-56, 2011.

NEITZKE, R. S.; BARBIERI, R. L.; RODRIGUES, W. F.; CORRÊA, I. V.; CARVALHO, F. I. F. **Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental**. Horticultura Brasileira 28: 47-53, 2010.

PEREIRA, M. G. M. **Identificação de Marcadores Moleculares Ligados a um Gene Mutado de Resistência ao Oídio (*Erysiphe pisi* Syd.) em Ervilha (*Pisum sativum* L.)**. Faro, Portugal: Universidade do Algarve, 2006.

PINHEIRO, J. B.; AMARO, G. B. de; PEREIRA, R. B. **Nematoides em pimentas do gênero *Capsicum***. Circular Técnica n. 104, Embrapa: Brasília – DF. Out. 2012.

PINHEIRO, J. B. **Nematoides em hortaliças**. Brasília – DF: Embrapa, 2017.

RAMALHO, M. A. P.; REIS, C. A. F. Melhoramento genético de plantas no Brasil: passado, presente e futuro. In: VIDAL NETO, F. C.; CAVALCANTI, J. J. V. (Ed.). **Melhoramento Genéticos de Plantas no Nordeste**. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

REFAAT, M. H.; ELGARHY, H. A. S. **Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on ISSR-PCR markers in pepper (*Capsicum annuum* L.)**. Annals of Agric. Sci. Moshtohor, 45: 1565-1579, 2007

RÊGO, E. R.; FINGER, F. L.; NASCIMENTO, N. F.; ARAÚJO, E. R.; SAPUCAY, M. J. L. C. Genética e Melhoramento de pimenteiras *Capsicum* spp. In: RÊGO, E. R.; FINGER F. L.; RÊGO, M. M. **Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum* spp.)**. Areia-PB: Universidade Federal da Paraíba. 223p. 2011b.

RÊGO, E. R.; FINGER, L. F.; RÊGO, M. M. **Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum* spp.)**. Areia-PB: Universidade Federal da Paraíba. 223p. 2011a.

RÊGO, E. R.; RÊGO, M. M.; SILVA, D. F.; SANTOS, R. M. C.; SAPUCAY, M. J. L. C.; SILVA, D. R.; SILVA JÚNIOR, S. J. **Selection for leaf and plant size and longevity of ornamental peppers (*Capsicum* spp.) grown under greenhouse condition**. Acta Horticulturae, 829:371-374, 2009.

RÊGO, E. R.; SANTOS, R. M. C.; NASCIMENTO, M. F.; NASCIMENTO, N. F. F.; SILVA, A. M. Produção de mudas e disponibilização de cultivares de pimenteiras: sustentabilidade, inclusão social e geração de trabalho e renda nas comunidades de Macacos e Furnas no brejo paraibano. In: MIRANDA, V. C. M.; SOBRINHO, R. G. S.; RÊGO, E. R. (Eds). **Sustentabilidade, Inclusão Social e Geração de Trabalho e Renda – Perspectivas de Extensão Universitária**. Areia, Universidade Federal da Paraíba. p. 11-3-. 2012.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, Comunicação para transferência de tecnologia/ EMBRAPA hortaliças, 2000. 113 p.

RIBEIRO, C.S. da C.; CRUZ, D.M.R. Tendências de mercado. Cultivar HF, RS, p. 16-19, jun./jul., 2002.

SANTOS, P. V. **Reação de acessos de pimenteiras (*Capsicum* spp.) a *Meloidogyne incognita* RAÇA 3**. Ilhéus, BA: UESC, 2008.

SEGATTO, F. B. **Avaliação da qualidade “pós-produção” de pimenta ornamental (*Capsicum annuum* L.) cultivada em vaso**. Viçosa, MG: UFV, 2007.

SIKORA, R. A.; FERNANDEZ, E. Nematodes parasites of vegetables. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. Wallingford UK: CAB International, p. 319-392, 2005.

STOMMEL, J. R.; BOSLAND, P. W. Ornamental pepper, *Capsicum annuum*. In: ANDERSON, N. O. **Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century**. Netherlands: Springer. p. 561-599. 2007.

TATINENI, V.; CANTRELL, R. G.; DAVIS, D. D. **Genetic diversity in elite cotton Germoplasm determined by morphological characteristics and RADPs**. *Crop Sci.*, 36: 186-192. 1996.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas ornamentais**. RS: Ed. Agropecuária, 59p., 2003.

VIEIRA, P. M. H. **Identificação de Marcadores de Genes de Resistência a Patógenos em Eucalipto e Soja por RGA**. Alegre, ES: Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.