José Getúlio da Silva Filho; Maria Esther de Noronha Fonseca; Leonardo Silva Boiteux. Marcadores funcionais relacionados com a coloração de fruto em espécies de *Capsicum*: Análise de polimorfismos na região promotora do gene codificador da Capsantina-capsorubina sintase. 2010. Horticultura Brasileira 28: S2630-S2635.

Marcadores funcionais relacionados com a coloração de fruto em espécies de *Capsicum*: Análise de polimorfismos na região promotora do gene codificador da Capsantina-capsorubina sintase.

José Getúlio da Silva Filho[1,2]; Maria Esther de Noronha Fonseca[1,3]; Leonardo Silva Boiteux[1,3]

[1]Embrapa Hortaliças – Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPH). BR-060, Km 09, 70359-970, Brasília – DF; [2]Departemento de Botânica, Universidade de Brasília (UnB); [3]CNPq/MCT bolsista de produtividade, jgetulio@cnph.embrapa.br; mesther@cnph.embrapa.br; boiteux@cnph.embrapa.br.

RESUMO

Existe uma grande diversidade fenotípica em relação à característica de coloração de fruto maduros no gênero *Capsicum*. Esta amplitude de colorações é controlada por distintos genes e pode variar desde o branco até vermelho intenso, passando por acessos com frutos amarelo claros, amarelo intenso, laranjas, arroxeados e marrons. Genes codificadores de enzimas da via biossintética dos pigmentos carotenóides têm sido avaliados como marcadores funcionais para cor de fruto em *C. annuum*. O gene codificador da Capsantina-capsorubina sintase tem sido um dos principais alvos destes estudos uma vez que esta enzima está envolvida na síntese dos principais pigmentos (capsantina e capsorubina), relacionados com a típica coloração vermelha dos frutos maduros de *Capsicum*. Foi utilizado DNA genômico extraído de 24 acessos pertencentes a quatro espécies: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum*. Foram desenhados os iniciadores de síntese específicos para a região do promotor do gene codificador da enzima capsantina-capsorubina sintase (CCS) a partir de sequencias depositadas no GenBank. Os iniciadores utilizados foram: 'CCSpro1for' e 'CCSpro1rev' capazes de amplificar um segmento de 900 pb em acessos de *C. annuum*. A região do promotor, delimitada pelos iniciadores de síntese 'CCSpromo1for' e 'CCSpromo1rev' não foi amplificada a partir de DNA genômico extraído dos acessos *C. annuum* 'CNPH 0181' e 'CNPH 0645' (ambos de coloração amarela). Um único amplicon (de tamanho variável) foi detectado nos demais acessos de coloração vermelha e em um acesso de coloração amarela (*C. frutescens* 'CNPH 2871'). O tamanho do amplicon apresentou uma associação espécie-específica estando relacionados da seguinte forma: amplicon de 920 bp foi observado exclusivamente em acessos de *C. annuum*. O amplicon de 998bp foi observado apenas em acessos de *C. baccatum* e *C. frutescens*. O amplicon de 1117 bp foi observado na maioria dos acessos de *C. chinense* e um acesso classificado como *C. frutescens*. Desta forma, este trabalho revela diferenças estruturais na região do promotor do gene CCS nas diferentes espécies e acessos de *Capsicum* analisados. Esta informação pode ser útil em sistemas de identificação de espécies/cultivares bem como em seleção assistida.

Palavras-chave: pigmentos, melhoramento molecular, carotenóides, compostos funcionais

ABSTRACT

Functional markers linked to mature fruit color in *Capsicum*: polymorphism analysis in the promoter region of gene coding for the capsanthin-capsorubin synthase.

There is a wide phenotypic variability for the trait mature fruit color in the genus *Capsicum*. This color variability is controlled by a number of genes and it might range from white to intense red color, encompassing shades of yellow, orange and chocolate brown. Genes encoding enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway have been analyzed as potential functional markers for mature fruit color in *C. annuum*. The gene enconding the *Capsanthin-capsorubin sintase* is one of the major targets due to the fact that this enzyme is responsible for the synthesis of the most important *Capsicum* carotenoids, which are related to the typical mature red fruit color. Genomic DNA was extracted from 24 accessions belonging to four species: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, and *C. baccatum*. Specific primers were synthetized targeting the promotor region of the gene coding for capsanthin-capsorubin synthase (CCS) using the genetic information available at the GenBank. A PCR primer pair ('CCSpro1for' and 'CCSpro1rev') able to amplify an amplicon of 900 bp in *C. annuum* accessions was used with genomic DNA from all accessions. A single (but variable in size) amplicon was obtained with the primer pair targeting the promotor region of the CCS gene using genomic DNA of all red-fruit accessions and also in one yellow-fruit accession (*C. frutescens* 'CNPH 2871'). However, no amplicon was observed using as template genomic DNA from *C. annuum* accessions 'CNPH 0181' and 'CNPH 0645' (both with yellow fruits). The amplicon profiles were mainly species-specific with the 920 bp being exclusively found in *C. annuum* accessions. The 998 bp amplicon was observed only in accessions of *C. baccatum* and *C. frutescens*. The 1117 bp amplicon was observed in the majority of the *C. chinense* accessions but also in one accession classified as *C. frutescens*. The present work indicates the presence of distinct molecular structures of the CCS promoter region across accessions and species of *Capsicum*. In addition, this information might be useful in fingerprinting and marker-assisted selection systems in distinct *Capsicum* accessions.

Keywords: pigments, molecular breeding, carotenoids, functional compounds

O continente americano é reconhecido como o centro de origem e de diversidade do gênero *Capsicum* mais especificamente em suas regiões tropicais (Reischneider, 2000). A Embrapa Hortaliças possui uma coleção de germoplasma que reflete esta diversidade especialmente na característica de cor de fruto que vai do branco ao vermelho intenso, contendo acessos com frutos amarelo claros, laranjas e marrons. Esta variação de cor é influenciada por vários genes. A via biossintética de carotenóides em *Capsicum* produz a maior diversidade de pigmentos conhecida em plantas cultivadas, embora a capsantina e capsorubina sejam os pigmentos principais (Ha et al., 2009). A expressão do locus *B* dominante resulta na expressão de alta quantidade de beta caroteno, no entanto a interação do gene *t* com o gene *B* produz uma variação no nível de b-caroteno (Lefebre *et al*., 1998). Em frutos maduros, o gene que retem a clorofila (*cl*) combinado com y^+ (fruto de cor vermelha) ou *y* (cor do fruto amarela) produz frutos marrons ou frutos verde oliva, respectivamente (Smith, 1950). Genes inibidores de pigmentos carotenóides, como c1 e c2, inibem a acumulação de carotenoides no fruto maduro (Lefebre *et al*., 1998). De modo geral, estes estudos indicam que o controle da coloração de fruto maduro é uma característica complexa envolvendo ligação e/ou interação de pelo menos quatro "loci" distintos: *c-1* and *c-2* (*carotene pigment inhibitors*), *cl* (*chlorophyll retainer*) e *y+* (fruto maduro vermelho versus fruto maduro amarelo).

O gene *y* foi caracterizado em *Capsicum annuum* e corresponde ao gene codificador da capsantina-capsorubina sintase (CCS). Uma deleção neste gene resulta no fenótipo cor amarela de fruto (Lefebre *et al*., 1998). O objetivo deste trabalho foi analisar a região promotora deste gene na busca de polimorfismos em 24 acessos representando quatro espécies do gênero *Capsicum*.

MATERIAL E MÉTODOS

DNA genômico foi extraído de 24 acessos de quatro espécies de *Capsicum*: *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq. e *C. baccatum* L com diferentes colorações de fruto maduros. A extração de DNA de folhas foi realizada pelo método CTAB utilizando 2 g de folhas maceradas em nitrogênio Líquido. O DNA foi ressuspedido em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e incubado por 24 horas a 4ºC. A concentração e a qualidade do DNA purificado foi estimada em gel de agarose 1% (p/v) através da comparação com um marcador de quantidade contendo DNA do fago l (lambda) na concentração de 10 ng/mL. Após a verificação do DNA estar intacto (sem degradação), analisou-se a concentração do DNA, procedeu-se a quantificação e o ajuste da amostras de forma a padroniza-las, e todos os materiais foram diluídos para a concentração final de 20 ng/µL em Tris 0,01M. Foram desenhados os iniciadores de síntese ("primers") 'CCSpromo1for' e 'CCSpromo1rev a partir da seqüência da CCS de *C. annuum* depositada no GenBank – www.ncbi.nlm.nih.gov (X77289). O produto de amplificação esperado após a amplificação via reação de cadeia da polimerase (polymerase chain reaction-PCR) corresponde a região promotora do gene da CCS (900 bases em *C. annuum*). A PCR foi realizada nos termocicladores PCR System 9700 (Applied Biosystems Co.). A concentração final dos reagentes usados na reação de 20 µL solução foi: DNA (20ng/mL), tampão PCR (1X) sem $MgCl_2$, dNTP 0,25mM, $MgCl_2$, 2,0 mM, iniciadores de síntese (0,2mM cada) e 1U Taq 'DNA Polymerase High Fidelity' (HiFi) (Invitrogen LifeTechnologies). As condições de PCR foram: ciclo inicial de desnaturação ($94^{o}C$ por 5 minutos), seguido de 30 ciclos repetidos com as temperaturas de $96^{o}C$ por 30 segundos, $53^{o}C$ por 1 minuto e $68^{o}C$ por 2 minutos, finalizando-se com um ciclo extra de extensão a $72^{o}C$ por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo. O produto de PCR foi sequenciado diretamente utilizando o kit BigDye (Applied Biosystems do Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve amplificação do fragmento correspondendo a um segmento da região promotora do gene codificador da capsantina-capsorubina sintase (CCS) nos acessos de C. annuum 'CNPH 0181' e 'CNPH 0645' (ambos de coloração amarela). No entanto, diferentes amplicons foram observados nos demais acessos analisados, incluindo um acesso de coloração amarela (C frutescens 'CNPH 2871') (Figura 1). Foram observados três tamanhos de amplicons da região do promotor, delimitada pelos inciadores de sintese 'CCSpromo1for' e 'CCSpromo1rev': 920 pb, 998 pb e 1117 pb (Figura 1). O tamanho do amplicon apresentou uma associação espécie-específica estando relacionados da seguinte forma: amplicon de 920 bp foi exclusivo de acessos de C. annuum. O amplicon de 998bp foi observado apenas em acessos de C. baccatum e C. frutescens. O amplicon de 1117 bp foi observado na maioria

dos acessos de C. chinense e um acesso classificado como C. frutescens. O sequenciamento parcial destes amplicons revelou que o produto corresponde à região promotora do gene codificador CCS. No entanto o tamanho da seqüência obtida não foi suficiente para identificar possíveis deleções nesta região. Este trabalho revela que possivelmente diferentes estruturas do promotor da CCS estão presentes nas diferentes espécies de Capsicum analisadas. Desta forma, a correlação entre as deleções encontradas neste gene e o fenótipo cor de fruto (amarelo, laranja ou vermelho) deverá ser avaliada levando em consideração a espécie em estudo e talvez não possa ser comum para todo o gênero.

REFERÊNCIAS

LEFEBVRE V; KUNTZ M; CAMARA B; PALLOIX A 1998. The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper *Plant Molecular Biology* 36: 785-789.

HA S-H; KIM J-B; PARK J-S; LEE S-W; CHO K-J 2007. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* 58: 3135 - 3144.

REIFSCHNEIDER, FJB. 2000. *Capsicum: Pimentas e Pimentões no Brasil.*

Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 113 pp.

SMITH PG. 1950 Inheritance of brown and green mature fruit color in peppers. *Journal of Heredity* 41: 138-140.

50º Congresso Brasileiro de Olericultura
1961
2010
Cinquenta anos contribuindo para a saúde da população brasileira
Guarapari - ES

Tabela 1. Identificação e características de coloração de fruto do banco de germoplasma de *Capsicum* utilizado neste estudo.

Acessos	Espécie de *Capsicum*	Cor do fruto maduro
CNPH 0189	*C. annuum*	Vermelho
Majjorca	*C. annuum*	Vermelho
CNPH 0148	*C. annuum*	Vermelho
CNPH 0181	*C. annuum*	Amarelo
CNPH 0183	*C. annuum*	Vermelho
CNPH 0645	*C. annuum*	Amarelo
CNPH 0679	*C. chinense*	Marrom
CNPH 2850	*C. chinense*	Vermelho
CNPH 0434	*C. chinense*	Vermelho
CNPH 2852	*C. chinense*	Branco
CNPH 2836	*C. chinense*	Amarelo/alaranjado
CNPH 0578	*C. chinense*	Branco
CNPH 0280	*C. chinense*	Vermelho
CNPH 3257	*C. frutescens*	Vermelho
CNPH 3000	*C. frutescens*	Vermelho
CNPH 2871	*C. frutescens*	Vermelho
CNPH 0579	*C. frutescens*	Vermelho
Tabasco	*C. frutescens*	Vermelho
CNPH 1397	*C. baccatum*	Vermelho escuro
CNPH 1363	*C. baccatum*	Vermelho
CNPH 1364	*C. baccatum*	Vermelho
CNPH 0992	*C. baccatum*	Laranja
CNPH 3017	*C. baccatum*	Laranja
CNPH 0279	*C. baccatum*	Laranja

50º Congresso Brasileiro de Olericultura
1961
2010
Cinquenta anos contribuindo para a saúde da população brasileira
Guarapari - ES

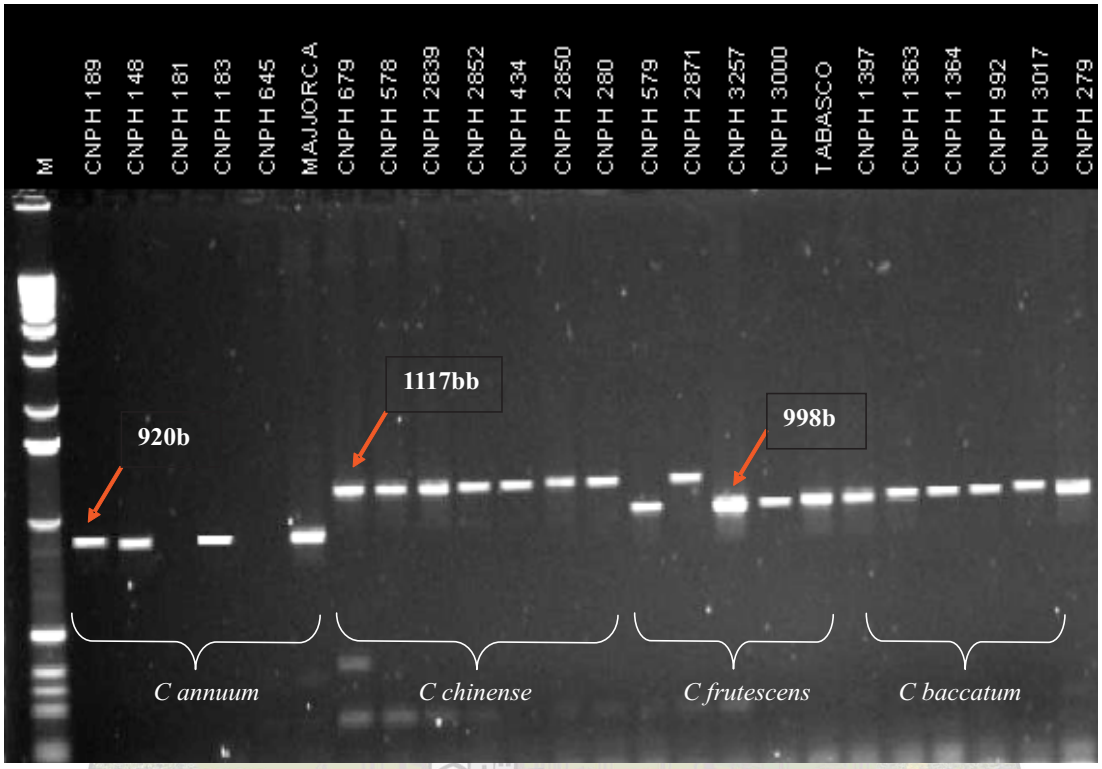

Figura 1. Amplicons correspondentes a região promotora do gene que codifica a capsantina-capsorubina sintase analisados em gel de agarose 1% corados com brometo de etila.

1961 2010
Cinquenta anos contribuindo para a saúde da população brasileira
Guarapari - ES