

ASPECTOS CLÁSSICOS E MOLECULARES NO MELHORAMENTO
DE PIMENTÃO VISANDO À RESISTÊNCIA À MANCHA
BACTERIANA

MARLON PERES DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JUNHO – 2007

ASPECTOS CLÁSSICOS E MOLECULARES NO MELHORAMENTO
DE PIMENTÃO VISANDO À RESISTÊNCIA À MANCHA
BACTERIANA

MARLON PERES DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal

Orientadora: Profa. Rosana Rodrigues

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JUNHO – 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 069/2007

Silva, Marlon Peres da

Aspectos clássicos e moleculares no melhoramento de pimentão visando à resistência à mancha bacteriana / Marlon Peres da Silva. - 2007.

90 f. :il.

Orientador: Rosana Rodrigues

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2007.

Bibliografia: f. 74 – 90.

1. *Capsicum annum* L. 2. Resistência a doenças. 3. Hortaliça 4. Mancha bacteriana 5. Melhoramento de Planta I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologia e Agropecuárias. II. Título.

CDD – 635.6432

ASPECTOS CLÁSSICOS E MOLECULARES NO MELHORAMENTO
DE PIMENTÃO VISANDO À RESISTÊNCIA À MANCHA
BACTERIANA

MARLON PERES DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal

Aprovada em 15 de junho de 2007

Comissão examinadora:

Profa. Norma Eliane Pereira (Doutora, Produção Vegetal/Melhoramento de
Plantas) - UESC

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph. D., Melhoramento de Plantas) - UENF

Prof. Antonio Teixeira Amaral Júnior (Doutor, Genética e Melhoramento) - UENF

Profa. Rosana Rodrigues (Doutora, Produção Vegetal/Melhoramento de Plantas) -
UENF
(Orientadora)

A toda minha família, em especial ao meu filho Pedro, minha sobrinha Luiza, meus avós maternos Antônio Sachetto (in memorian) e Júlia Perassoli Sachetto (in memorian) e avós paternos Clemente Peres da Silva e Júlia Garcia da Silva... os melhores doutores que uma vida pode proporcionar.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, como sempre, gostaria de agradecer a Deus, e à Nossa Senhora, por olhar por todos seus filhos dia a dia.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, pela oportunidade concedida de realizar um estudo de pós-graduação dessa importância.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pelo auxílio financeiro nas pesquisas laboratoriais.

À professora Rosana Rodrigues, pela orientação, paciência e exigência profissional em todas as etapas da pesquisa.

A todos os professores do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal - LMGV, em especial aos professores Antônio Teixeira do Amaral Júnior, Messias Gonzaga Pereira e Alexandre Pio Viana.

Ao pessoal da Unidade de Apoio à Pesquisa - UAP, coordenada pelo amigo Jader, imprescindível no trabalho de campo.

Ao meu grande amigo e profissional exemplar Fábio Luiz Partelli, companheiro de futebol pela televisão e para assuntos aleatórios.

Às colegas de laboratório, equipe 110, Cláudia, Cíntia, Elaine, Mina, Kenea, Sarah e Rebeca, pelo profissionalismo de todas e pelas várias horas queimando as mãos com tanta pimenta.

Aos parceiros nos “Marcadores Moleculares” (cadê a banda?), Leandro, Monique e Vitória; trabalho de fé... tem que acreditar que a marca vai estar lá!

Aos meus grandes amigos do “Cavalo de Tróia”, Thiago e Luiz, nunca fomos tão reais quanto num palco.

À minha família, tanto tempo longe! Mas todos estavam no meu pensamento e coração.

À minha esposa Giselda, competência em pessoa. Obrigado pela paciência, compreensão, auxílio e por gostar do U2.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | ix |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. Origem, domesticação e botânica do gênero <i>Capsicum</i> | 4 |
| 2.2. Aspectos econômicos e nutricionais | 6 |
| 2.3. Mancha-bacteriana | 7 |
| 2.4. Pungência | 12 |
| 2.5. Seleção assistida por marcadores moleculares | 14 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1. Localização e características da área experimental | 20 |
| 3.2. Material vegetal e condições de cultivo | 20 |
| 3.3. Herança da resistência à mancha-bacteriana | 24 |
| 3.4. Características agronômicas avaliadas | 27 |
| 3.5. Análise de pungência | 27 |
| 3.6. Análise molecular por marcadores RAPD | 28 |
| 3.6.1. Seleção de iniciadores | 29 |
| 3.7. Análises estatísticas | 30 |
| 3.7.1. Análise de variância | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.7.2. Comparação entre as médias | 32 |
| 3.7.3. Estimativa dos parâmetros genéticos com base na população F ₂ | 32 |
| 3.7.4. Teste de qui-quadrado (χ^2) | 34 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1. Avaliação da resistência à mancha-bacteriana | 35 |
| 4.1.1. Herança da resistência com base em F ₂ | 39 |
| 4.1.2. Análise com base nas linhas F ₃ | 45 |
| 4.1.3. Teste de médias | 46 |
| 4.2. Características avaliadas nos frutos | 50 |
| 4.2.1. Teste de médias para características agronômicas | 51 |
| 4.3. Herança da pungência..... | 55 |
| 4.4. Parâmetros genéticos..... | 60 |
| 4.4.1. Reação à mancha-bacteriana com base na população F ₂ | 60 |
| 4.4.2. Reação à mancha-bacteriana com base nas 28 linhas F ₃ | 63 |
| 4.4.3. Caracteres agronômicos - frutos | 65 |
| 4.5. Análise molecular | 67 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES | 72 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 74 |

RESUMO

SILVA, Marlon Peres; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; junho, 2007. Aspectos clássicos e moleculares no melhoramento de pimentão visando à resistência à mancha-bacteriana. Professora orientadora: Rosana Rodrigues.

As hortaliças têm um papel relevante tanto do ponto de vista econômico quanto nutricional, recebendo cada vez mais investimentos que resultam em aumento de produção. Entre os fatores limitantes para o cultivo de hortaliças estão as doenças de diversas etiologias. Na cultura do pimentão, a mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (nova classificação proposta: *Xanthomonas euvesicatoria*), é considerada como uma das principais doenças bacterianas em todas as regiões produtoras no mundo. Este trabalho teve como objetivo estudar a herança da resistência a uma nova raça deste patógeno, considerando técnicas de melhoramento clássico e marcadores RAPD. Foram avaliadas populações F₂ e F₃ do cruzamento entre o acesso UENF 1381 (pimenta, resistente) e a cultivar *Early California Wonder*-ECW (pimentão, suscetível à mancha-bacteriana). A avaliação fenotípica da resistência foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, em casa de vegetação, em dois anos consecutivos (2005 e 2006). Avaliaram-se dez

indivíduos UENF 1381 e dez ECW, 20 híbridos F₁ e 86 plantas F₂ no primeiro experimento e dez indivíduos UENF 1381, dez ECW, dez híbridos F₁, 40 plantas F₂ e 28 linhas F₃ no segundo. A inoculação da suspensão bacteriana, na concentração de 10⁵ ufc/ml, foi realizada 50 dias após a sementeira em folhas por meio de seringa hipodérmica. A avaliação iniciou-se a partir do quinto dia após a inoculação, tendo sido feita durante 13 dias, por meio de escala de notas e área abaixo da curva de progresso da doença. As notas foram atribuídas de acordo com os sintomas apresentados pelas plantas, considerando-se resistentes os indivíduos que receberam notas 1 e 2 e suscetíveis os que receberam notas 3, 4 e 5. As características agrônômicas peso médio de frutos, comprimento médio de frutos e diâmetro médio de frutos também foram avaliadas nas linhas F₃. Estudou-se a herança da capsaicina avaliando-se a sua presença por meio de um teste de reação da placenta dos frutos imersos em uma solução de vanadato de amônio. Uma análise com base em marcadores moleculares do tipo RAPD foi conduzida para detectar a presença de bandas ligadas à resistência e/ou à capsaicina. Constatou-se herança monogênica para a resistência à mancha-bacteriana e para presença de capsaicina nos frutos, pelo teste de qui-quadrado. Para a mancha-bacteriana, estimou-se herdabilidade no sentido amplo (h_a^2), nos valores de 68,13 e 73,54%, para o primeiro e o segundo experimentos, respectivamente, observando-se a interação alélica do tipo dominância parcial. Constatou-se a presença de um gene dominante também para a presença de capsaicina. Na análise molecular, dos 458 iniciadores testados apenas 39 detectaram polimorfismo. Entretanto, as marcas polimórficas não mostraram qualquer relação com a resistência à mancha-bacteriana ou com a pungência dos frutos. As linhas F₃ mais promissoras, com resistência e ausência de pungência, associadas às características agrônômicas de peso, comprimento e diâmetro médio dos frutos, foram 2, 11, 19 e 26. Em termos de pimenta, considerando-se os mesmos critérios, as linhas mais promissoras foram 17, 21 e 25.

ABSTRACT

SILVA, Marlon Peres; D. SC; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; June, 2007. Classics and molecular aspects in pepper breeding for bacterial spot resistance. Advisor: Rosana Rodrigues.

The vegetables play an important role either considering economic or nutritional aspects, and more investments have been done to increase vegetable yield. Diseases caused by different microorganisms are limiting factors for vegetable crops. In sweet pepper, bacterial spot, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (new classification proposed *Xanthomonas euvesicatoria*), is considered one of the most important bacterial disease all over the world. This research aimed to study the inheritance to a new race of that pathogen, based on classical and molecular approaches. F₁, F₂ and F₃ populations from crosses between the accession UENF 1381 (hot pepper, resistant) and the variety Early California Wonder–ECW (sweet pepper, susceptible) were evaluated for bacterial spot resistance and pungency. The phenotypic evaluation was carried out in a complete randomized design in greenhouse during two different seasons (2005 and 2006). Ten individuals of each parent, 20 F₁ hybrids and 86 F₂ plants were tested in the first experiment and ten individuals of each parent and F₁, 40 F₂ plants and 28 F₃ lines were tested in the

second one. Bacterial suspension was inoculated when plants were 50 days old. The inoculation was performed infiltrating 10^5 cfu/mL using a hypodermic needle. Evaluation started five days after the inoculation and it was carried out during 13 days, considering a scale according to the symptoms, with 1 and 2 for resistant plants and 3, 4 and 5 for susceptible ones. Area under curve of progress disease was also determined. Agronomic traits, mean fruit weight, mean fruit length and mean fruit diameter were registered in F_3 lines. Capsaicin inheritance was studied evaluating the presence of this alkaloid in a reaction with placenta fruit immersed in an ammonium vanadate solution. A molecular analysis based on RAPD markers was carried out to detect bands that co-segregate with resistance and/or capsaicin presence. Monogenic inheritance was observed for bacterial spot resistance and for capsaicin presence in fruits, using a chi-square test. For bacterial spot resistance, it was possible to calculate values of wide-sense heritability (h_a^2) of 68.13 and 73.54%, for the first and the second experiment, respectively, observing the occurrence of partial dominance as the type of allelic interaction. From 458 primers tested, 39 showed polymorphism, although none of them had co-segregated with resistance or pungency. The more promising F_3 lines, with resistance and non-pungent, associated to the agronomic traits of weight, length and diameter average of fruits were 2, 11, 19 and 26. In hot pepper, considering the same criteria, the most promising lines were 17, 21 and 25.

1. INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é cultivado em todo o território brasileiro e é considerado uma das dez hortaliças de maior importância econômica no mercado nacional. O Sudeste é a principal região produtora e representa também os grandes centros consumidores (Echer et al., 2002), destacando-se o Estado do Rio de Janeiro (Aguilar et al., 2003).

Além do consumo *in natura* ou processado (condimentos, conservantes e corantes), os frutos de *Capsicum* também podem ser utilizados na confecção de remédios e até mesmo na indústria bélica, como aerossol de pimenta. Frutos de algumas variedades de *Capsicum annuum* L. apresentam pungência (ardência) como característica principal, conferida por substâncias alcalóides denominadas capsaicinóides. Há mercado consumidor tanto para frutos com alta pungência (pimentas picantes e uso farmacêutico) como para frutos sem pungência (consumo *in natura* de pimentões, pimentas doces e uso como corantes) (Wagner, 2003).

Apesar dessa hortaliça ser bastante apreciada no país, o surgimento de doenças, tanto de origem biótica quanto abiótica, representa um verdadeiro desafio à sua produção (Fontes, 2003), destacando-se a mancha-bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones et al., 2004). Esta doença representa um dos fatores limitantes à produção do pimentão (Kousik e

Ritchie, 1998), podendo devastar áreas inteiras de produção comercial dessa cultura em regiões do mundo com alta umidade e temperatura elevada (Tai et al., 1998).

A ocorrência de doenças acarreta relevante queda de rendimentos e lucratividades das culturas, sendo necessária a implementação de estratégias objetivando a utilização preventiva de medidas integradas de controle, as quais mantêm os agentes bióticos nocivos à cultura em população e intensidade inferiores ao nível de dano econômico por eles provocado. Dentre as medidas sugeridas, destaca-se a resistência genética, que possibilita a redução de custos em relação ao controle químico restrito e intensivo, racionalizando as práticas culturais integradas, e atende aos interesses ecológicos devido à reduzida ação de fatores de desequilíbrio do ecossistema (Martines et al., 2005).

O desenvolvimento de cultivares resistentes é uma das maiores contribuições do melhoramento das hortaliças devido, diretamente, aos ganhos de produtividade e redução dos custos de produção e, indiretamente, por auxiliar sobremaneira o controle integrado de pragas e doenças, resultando em produtos de melhor qualidade do ponto de vista toxicológico (Carrijo, 1991). A obtenção de genótipos resistentes, associada a uma excelente produção quantitativa e qualitativa, diminui o risco de desequilíbrio biológico (O Agrônomo, 2002).

Com este intuito, nos últimos anos, houve grande interesse no desenvolvimento de cultivares de pimentão resistentes à mancha-bacteriana, por meio da identificação e incorporação de genes de resistência bem como pela identificação das distintas raças da bactéria, classificadas com base na resposta hipersensível às linhas quase isogênicas da cultivar "*Early California Wonder*" (ECW 10R, ECW 20R e ECW 30R), as quais possuem os genes de resistência *Bs1*, *Bs2* e *Bs3*, respectivamente (Sahin e Miller, 1998). Essa classificação das raças também possibilitou observar a importância da raça 6 por se tratar de uma raça que supera todos os genes de resistência conhecidos (Kousik e Ritchie, 1996), tornando-a de extrema importância para futura identificação de novas fontes de resistência.

A resistência genética é a melhor estratégia de controle, e o conhecimento dos genes de resistência é fundamental para uma maior proteção efetiva contra as doenças. O conhecimento do número de genes envolvidos, assim como o fenótipo da reação do hospedeiro à infecção, o estágio de desenvolvimento da planta em que a resistência se expressa, as interações com o

ambiente, os mecanismos genéticos envolvidos, entre outros, também são aspectos importantes a serem considerados (Ceruti e Lazzari, 2003).

Com os últimos adventos da biotecnologia, vem aumentando a importância da utilização de marcadores moleculares na possível identificação de indivíduos resistentes a doenças, otimizando as avaliações e resultando em maior eficácia para os pesquisadores. Entretanto, o uso dos marcadores no auxílio do processo de melhoramento requer sua identificação prévia em cultivares de interesse (Corrêa et al., 2001). Neste aspecto, análises de polimorfismo de DNA com marcadores do tipo RAPD vêm sendo amplamente utilizadas na identificação e seleção eficiente dos genótipos que possuem combinações específicas de genes de resistência (Ferreira et al., 1999; Alzate-Marin et al, 1999; Corrêa et al., 2001; Faleiro et al., 2003).

Este trabalho objetivou estudar a herança da resistência à mancha bacteriana em populações obtidas a partir do cruzamento entre o acesso UENF 1381 (pimenta resistente) e a variedade ECW (pimentão suscetível), bem como estudar a herança envolvida no controle da pungência e analisar, via marcadores RAPD, possíveis marcas associadas à resistência e sua utilização em futuros programas de melhoramento envolvendo genótipos resistentes à doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem, domesticação e botânica do gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum* possui cerca de 27 espécies, sendo composto por um grupo de plantas cujos frutos não apresentam pungência, denominados pimentões, e um segundo grupo, denominado pimentas, formado por frutos que apresentam pungência devido à presença de alcalóides (capsaicinóides) (Bosland, 1996). Vários especialistas argumentam sobre o número correto de espécies já classificadas em razão do processo contínuo de identificação e inclusão de novos genótipos, sendo passível de mudanças (DeWitt e Bosland, 1997).

Nas expedições realizadas por Vavilov, no período de 1930 a 1933, estão registradas as coletas das espécies *Capsicum annuum* L. (pimentão) e *Capsicum frutescens* (pimenta) nas regiões do sul do México e América Central (History Vavilov, 2004). Acredita-se, com base nestes dados, que o centro de origem e diversidade do gênero *Capsicum* corresponde ao Centro Mexicano do Sul e Centro-Americano e ao Centro Sul-Americano (Peru - Equador – Bolívia).

A variabilidade genética no gênero *Capsicum* é muito ampla, com vasta distribuição geográfica compreendendo desde o Sul dos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul até a Bolívia, Argentina, Uruguai e Sul do Brasil

(Casali e Couto, 1984). É incontestável a idéia de que este gênero tem origem nas Américas, e que o Brasil é um importante centro secundário das espécies domesticadas do gênero *Capsicum*, devido à considerável diversidade observada, excluindo-se *C. pubescens*, a qual praticamente não se verifica no país (Reifschneider, 2000). Este autor acredita que o centro primário de diversidade de *C. annuum* var. *annuum* inclui o México e a América Central, com centros secundários no Sudeste e Centro europeu, Ásia, África e partes da América Latina.

As espécies cultivadas de *Capsicum*, com ampla distribuição em grande parte do mundo, são *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* e *Capsicum pubescens* (Wagner, 2003).

Duas das cinco espécies domesticadas, *C. baccatum* e *C. pubescens*, não migraram para além da América do Sul, sendo que a domesticação de *C. baccatum* iniciou-se na Bolívia, Equador, Peru e Chile, enquanto a de *C. pubescens* deu-se nos Andes. As outras três espécies, *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, foram domesticadas mais tarde, respectivamente, no México, na região Amazônica (ou possivelmente no Peru) e no Sudeste da América Central (DeWitt e Bosland, 1997).

Espécies de *Capsicum* com $n = 12$ cromossomos são compostas por três complexos gênicos, definidos como: *C. annuum*, *C. baccatum* e *C. pubescens*. Um complexo gênico inclui espécies passíveis de cruzamentos, mesmo que isto apresente certa dificuldade (Tong e Bosland, 1999). A distribuição do gênero ocorreu de acordo com o complexo gênico das espécies, associada às condições climáticas favoráveis a cada complexo. As espécies do complexo *C. pubescens*, caracterizadas pelas flores de cor púrpura, encontram-se nas regiões altas dos Andes, estendendo-se pelo Norte da América Central e México. As espécies presentes no complexo *C. baccatum*, detentoras de flores brancas, apresentam características relacionadas a ambientes secos, podendo ter sido originadas na região Centro-sul da Bolívia. E, por fim, o outro complexo, formado por flores brancas, *C. annuum*, que possivelmente se originou nas regiões tropicais baixas da América do Sul e Central, devido sua afinidade com ambientes mais úmidos (Viñals et al., 1996).

Capsicum annuum é a espécie mais cultivada do mundo, com diversas variedades, distribuídas entre os pimentões e pimentas doces, pimentas, e ornamentais (DeWitt e Bosland, 1997; Reifschneider 2000), com frutos que são

bagas ocas, de formato cúbico ou cônico e, quando maduros, podem ter coloração vermelha ou amarela, dentre outras (Filgueira, 2000).

As flores desse gênero são formadas por órgãos masculinos e femininos facilmente distinguíveis, ou seja, hermafroditas. Esta estrutura permite destacar que seu modo de reprodução é preferencialmente condicionado à autogamia. Porém, a polinização cruzada pode ocorrer (DeWitt e Bosland, 1997), podendo o plantio conjunto, de diferentes variedades, apresentar cerca de 16,5% de polinização cruzada, devido à atuação de dispersores de pólen como abelhas e o vento (Filho, 2004). Essa percentagem pode variar entre 30 e 70% de polinização cruzada dependendo do local e época de cultivo, superando resultados encontrados em tomate (DeWitt e Bosland, 1997).

2.2. Aspectos econômicos e nutricionais

O agronegócio brasileiro vem se apresentando como uma atividade próspera, segura e rentável, destacando-se como um dos principais combustíveis da economia brasileira por ser responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB), 42% das exportações totais e 37% dos empregos gerados (MAPA, 2007).

A produção de hortaliças ganha maior importância quando se trata de lucratividade por unidade de área, devido ao reconhecimento de seus altos índices de rentabilidade em relação às grandes culturas, além dos fatores ligados ao significativo número de empregos gerados no campo e nos setores de insumos, comercialização, entre outros, indicando sua importância na economia brasileira. Estima-se que a área ocupada por esse segmento no país corresponda a 773.190 mil hectares, com produção de 17,4 milhões de toneladas de hortaliças e produtividade média de 22.500 t/ha (FAO-FAOSTAT, 2006).

O pimentão ocupa papel significativo na olericultura brasileira, porque corresponde à terceira espécie mais cultivada da família Solanaceae, sendo a batata e o tomate os mais importantes (Sacchi et al., 2003). É cultivado em todo o território brasileiro, com cerca de 13.000 ha de área cultivada e produção de, aproximadamente, 280.000 toneladas de frutos (Carvalho et al., 2003). Destaca-se a Região Sudeste como a principal produtora (Echer et al., 2002), a qual é responsável anualmente por cerca de 120.000 toneladas de frutos em, aproximadamente, 5.000 ha de área cultivada (Ribeiro, 2006).

A expansão do comércio de sementes de pimentão, gerando somente no mercado interno valores correspondentes a US\$ 1,5 milhão, reforça

a importância da cultura na atividade agrícola do país (Ribeiro e Cruz, 2003).

Por ano, a comercialização interna dessa cultura atinge valores em torno de R\$ 90 milhões (IBGE, 2006). Já com relação às exportações envolvendo o agronegócio brasileiro, a exportação de pimenta, pimentão e seus derivados, no ano de 2005, atingiu receita em torno de US\$ 79 milhões (MAPA, 2007).

Os frutos de *Capsicum* podem ser comercializados *in natura* ou em conservas; sua utilização também pode ser feita na forma de molhos e condimentos (Viñals et al., 1996). A páprica, obtida da secagem e moagem do fruto, tem papel importante no setor da culinária, cosméticos e fins medicinais (Bosland, 1996).

No Brasil, a área cultivada para processamento industrial na forma de pó (páprica) ainda é muito pequena (menos de 2.000 ha), exportando-se grande parte da produção. O consumo interno, na forma desidratada, restringe-se à indústria de alimentos como condimento ou tempero para sopas de preparo instantâneo e em molhos, além de venda a varejo, que é comercializada em pequenos frascos. Já para o mercado externo, a alta qualidade do produto é um fator essencial, exigindo-se a escolha de uma cultivar adequada, com polpa grossa, alto teor de pigmentos, elevado rendimento industrial e que produza um pó estável (Ribeiro e Cruz, 2003).

Todas as formas de pimentão utilizadas pelo homem são de frutos bem desenvolvidos, carnosos, de sabor suave e utilizados, principalmente, em vários tipos de saladas, podem também ser consumidos maduros, frescos, secos em pó e em conserva, apresentando elevado valor dietético (Viñals et al., 1996).

Dentre seus constituintes nutricionais, estão presentes as vitaminas A, B₁, B₂, e C, sendo os frutos consumidos *in natura* ricos em vitaminas C, e os frutos de coloração vermelha, em vitamina A e carotenóides (Viñals et al., 1996). A quantidade de vitamina C (180 miligramas por 100 gramas) presente em um fruto de pimentão vermelho é suficiente para suprir as necessidades diárias de até seis pessoas, o que destaca os frutos de *Capsicum* como fontes importantes de antioxidantes naturais como a própria vitamina C, além dos carotenóides e a vitamina E (Ribeiro, 2006). Possuem também proteínas, glicídios, lipídios, minerais, água e pequena taxa de matéria seca, cerca de 20 a 24% (Reifschneider, 2000).

2.3. Mancha-bacteriana

É considerada a principal doença bacteriana do pimentão em cultivos que apresentem condições sujeitas à alta temperatura e umidade, fatores que favorecem uma ocorrência freqüentemente severa (Smith et al., 1998; Pernezny e Momol, 2005). A atual classificação proposta para o agente causador da mancha-bacteriana é *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones et al., 2004). Essa bactéria é classificada como gram-negativa, baciliforme, possuindo um flagelo polar, o qual auxilia sua mobilidade (Kurozawa e Pavan, 1997). Em meio de nutriente-ágar, ocorre a formação de colônias grandes, fluidas e lisas de coloração amarelada (EPPO, 2003).

Dados apresentados pela *European and Mediterranean Plant Protection Organization* - EPPO (organização intergovernamental responsável pela cooperação européia em cuidados com culturas comerciais, 2003) ressaltam o tomate e o pimentão como principais hospedeiros dessa bactéria e registram também a presença de ervas daninhas atuando como hospedeiros incidentais, fato este último que possibilita a manutenção da mesma em áreas afetadas.

No Brasil, a ocorrência da mancha-bacteriana em pimentão foi relatada pela primeira vez em 1947, na Região Nordeste do Brasil, sendo considerada, posteriormente, uma das doenças de hortaliças mais difundidas em todos os Estados do Brasil (Kimura e Carmo, 1996).

Embora dados numéricos quanto aos prejuízos causados pela mancha-bacteriana não estejam disponíveis, a agricultura brasileira e mundial é bastante afetada por doenças causadas por espécie do gênero *Xanthomonas*, ocasionando assim perdas substanciais em várias culturas de importância econômica (Andrade et al., 2005).

Na descrição dos sintomas da mancha-bacteriana, apesar de infectar severamente a planta na sua fase inicial, essa doença pode causar danos em qualquer fase de seu desenvolvimento, sendo todos os órgãos aéreos da planta afetados (Kurozawa e Pavan, 1997). As infecções são mais abundantes nos períodos chuvosos, em que as lesões se desenvolvem mais rapidamente em número e tamanho (Carmo et al., 1996).

A multiplicação da bactéria em alta quantidade nas folhas promove lesões com aspecto de manchas aquosas (Pierre et al., 2000). Essas pequenas manchas podem-se unir, causando sintomas de necrose e posterior abscisão. Com o avanço da doença, as folhas mais velhas apresentam lesões de formato irregular

e cor verde-escuro, com posterior amarelecimento e desfolha da planta (Pernezny e Momol, 2005). No caule, há formação de lesões pequenas, alongadas e de coloração marrom, e os frutos apresentam pequenas pústulas de formato circular, similares a verrugas (Lopes e Ávila, 2003).

Os danos diretos causados pela bactéria são representados pela redução da área foliar e, por conseguinte, pela diminuição da área fotossintética, o que acarreta redução significativa da produção e qualidade dos frutos, depreciando-os para o mercado consumidor e possibilitando sua disseminação via sementes (Wierzbicki, 2003). Frutos de *Capsicum* raramente apresentam sintomas, porém sua queda pode ocorrer devido à infecção precoce na planta (EPPO, 2003). Os danos causados nos frutos são incomuns em virtude da instalação da bactéria só ocorrer por meio de lesões provocadas via danos mecânicos ou ação de insetos (Viñals et al., 1996).

A principal forma de sobrevivência da bactéria, de uma colheita para outra, ocorre por meio de sementes e fragmentos infectados, como os talos das plantas (EPPO, 2003). Sementes contaminadas podem disseminar a bactéria a longas distâncias, podendo atingir até 15% de infecção, e sua viabilidade pode ser mantida por mais de 10 anos (Kurozawa e Pavan, 1997). Chuvas com ventos, seguidas de longo período de nebulosidade, podem favorecer a disseminação, penetração e multiplicação da bactéria, resultando em severa ocorrência da doença (Lopes e Ávila, 2003).

A erradicação da bactéria em sementes de pimentão e tomate ocorre por meio de tratamento térmico, utilizando-se calor seco como prática rotineira (Kimura e Carmo, 1996). Outra medida de controle é a rotação de culturas por três anos, evitando-se o uso de solanáceas (Kurozawa e Pavan, 1997). A utilização de sementes e mudas isentas do patógeno, produzidas por empresas idôneas, representa grande barreira na introdução da doença em áreas novas. Esta medida pode ser associada ao plantio fora de épocas quentes e sujeitas a chuvas freqüentes e à destruição dos restos culturais após a última colheita (Lopes e Ávila, 2003).

O controle químico do patógeno no campo é ineficiente devido a problemas como a aplicação inadequada, lavagem do produto por água de chuva ou irrigação, variantes resistentes do patógeno, entre outros. Outro fator importante é o método de condução da cultura, tais como o adensamento, uso de

irrigação por aspersores e outros, o que pode favorecer a disseminação do patógeno (Wierzbick, 2003).

Mesmo com o uso de medidas visando à redução da incidência da bactéria, o método de controle mais eficiente em relação a esse patógeno é a resistência genética (Yu et al., 1995).

Os mais variados trabalhos apresentados no Brasil e no exterior indicam um alto grau de variabilidade patogênica, devido à especialização do patógeno em distintas raças fisiológicas, apresentando especificidade por cultivares/linhagens dentro da mesma espécie. Essa alta variabilidade, associada às condições favoráveis de calor e umidade, favorece sua ocorrência e dificulta seu controle (Wierzbick, 2003).

As raças desse patógeno classificam-se de acordo com os genes de avirulência presentes no mesmo e a resposta de interação com os genes de resistência do hospedeiro, resultando em considerável variação de patogenicidade (Jones et al., 1998).

A dificuldade no controle da doença deve-se à existência de 11 raças desse patógeno já descritas para a cultura do pimentão (P0 a P10) (Wierzbick, 2003).

As distintas raças são classificadas utilizando-se as linhas quase-isogênicas da cultivar “*Early Calwonder*”, denominadas ECW-10R, ECW-20R e ECW-30R, as quais possuem os genes *Bs1*, *Bs2* e *Bs3*, respectivamente (Minsavage et al., 1990; Kousik e Ritchie, 1996). Estes três genes foram identificados nos acessos PI 163192 (*Capsicum annuum*), PI 260435 (*Capsicum chacoense*) e PI 271322 (*Capsicum annuum*) (Reifschneider e Lopes, 1997).

Entre os genes responsáveis pelo controle de resistência em relação às diferentes raças, o gene *Bs1* confere resistência às raças 0, 2 e 5; *Bs2* destaca-se dos demais, pois engloba as raças 0, 1, 2, 3, 7 e 8; o gene *Bs3* caracteriza-se pela resistência às raças 0, 1, 4, 7 e 9; já a cultivar *ECW*, por não apresentar nenhum dos três genes, é suscetível a todas as raças (Wangsomboondee, 2002).

A obtenção de genótipos com presença de genes de resistência que possibilitem sua utilização em programas de melhoramento é uma necessidade dos produtores e uma constante meta de vários pesquisadores, como Bongioiolo Neto et al. (1986), os quais identificaram três genótipos de *Capsicum* (CNPH 183, CNPH 187 e CNPH 703) como promissores fontes de resistência a vários grupos

de bactérias, para todas as regiões brasileiras.

Avaliando a resistência de acessos de pimenta à mancha-bacteriana, Adamson e Sowell Júnior (1982) concluíram que os indivíduos PI 322719 e PI 163192 apresentavam resistência controlada por um gene dominante, enquanto que, para o indivíduo PI 163189, os autores deduziram que dois genes podem estar envolvidos na resistência.

Kousik e Ritchie (1999) relatam que, no estudo de resistência envolvendo as raças 1 a 6 com as linhas quase-isogênicas de ECW, ECW 10R, ECW 20R e ECW 30R e as combinações ECW 12R (*Bs1* + *Bs2*), ECW 13R (*Bs1* + *Bs3*), ECW 23R (*Bs2* + *Bs3*) e ECW 123R(*Bs1* + *Bs2* + *Bs3*), em casa de vegetação e no campo, os dados obtidos demonstraram que a raça 6 supera todos os três genes de resistência utilizados comercialmente e suas combinações, sendo prioritário o estudo desta raça.

A raça 6 foi identificada inicialmente em *Huron County*, Estado de Ohio nos Estados Unidos, no ano de 1993. Por superar todos os genes de resistência conhecidos e caracterizar-se pela sua agressividade, esta raça favoreceu o aumento de sua presença na região e a busca da identificação de novas fontes de resistência (Sahin e Miller, 1995).

Os efeitos dos principais genes de resistência (*Bs1*, *Bs2*, e *Bs3*) e suas combinações foram testados em 15 cultivares comerciais envolvendo as raças 1 a 6. Cultivares sem genes de resistência, com um único gene, ou com a combinação dos genes *Bs1* e *Bs3* foram severamente atacadas, em comparação às cultivares não-inoculadas. Danos significativos das raças 4 e 6 foram observados em cultivares com o gene *Bs1* ou *Bs2*, sendo que a combinação destes dois genes apresentou baixo nível da doença. Um híbrido conhecido com a combinação *Bs1*, *Bs2* e *Bs3* apresentou o menor nível de infestação. De um modo geral, ocorreu predomínio das raças 3 e 6 na área (Kousik e Ritchie, 1998). Referindo-se à raça 6, os autores concluem que a combinação dos três genes de resistência apresentou uma proteção ligeiramente melhor quando comparada à combinação *Bs1* e *Bs2*, fato que os leva a sugerir que o custo, o tempo envolvido e a proteção oferecida no desenvolvimento de novas cultivares comerciais com três genes deveriam ser considerados.

Em uma avaliação envolvendo 170 acessos de *Capsicum* spp. como potenciais fontes de resistência à raça 6, registrou-se a presença de um único

acesso de *C. pubescens* (PI235047) como resistente a esta raça, gene denominado *Bs4*, que se destacou também pela resistência às raças 0, 1, 3 e 4 (Sahin e Miller, 1998). Entretanto, sua utilização como fonte de resistência em programas de melhoramento é inviável, visto que *C. pubescens* pertence a outro complexo gênico e não tem cruzabilidade com *C. annuum*.

Jones et al. (2002), trabalhando com avaliação de resistência à raça 6, envolvendo as linhagens ECW 12346 e ECW 123, bem como as gerações F₁, F₂ e retrocruzamentos, identificaram dois genes recessivos para a resistência, denominados *bs5* e *bs6*. O genótipo ECW 12346 foi obtido com resistência advinda de ECW 123 (genes *Bs1*, *Bs2* e *Bs3*), PI 271322 (*bs5*) e Pep 13 (*bs6*).

Outros trabalhos envolvendo resistência à mancha-bacteriana vêm sendo conduzidos. Costa et al. (2002) avaliaram híbridos F₁ de cruzamentos dialélicos entre cinco genótipos de pimentão, sendo três suscetíveis (UENF 1420, UENF 1421 e UENF 1422) e dois resistentes (UENF 1381 e UENF 1382), e constataram a presença de efeitos aditivos no controle genético da doença. Estudando a herança da resistência à mancha-bacteriana em populações segregantes do cruzamento entre Apolo (suscetível) e BGH 1772 (resistente), Juhász (2002) observou herança poligênica e recessiva para a resistência.

Avaliando 60 acessos de *Capsicum* do banco de germoplasma da UENF, para resistência à mancha bacteriana, Sudré (2003) testou duas concentrações de inóculo, 10³ e 10⁸ células/ml, pelo método de infiltração, constatando alta resistência de sete acessos avaliados. Riva et al. (2004), avaliando populações segregantes do cruzamento entre UENF 1421 e UENF 1381, observaram ação de três genes recessivos na herança do caráter.

Em condições de campo, Lobo et al. (2005) estudaram a herança da resistência à mancha-bacteriana no tomateiro, por meio do cruzamento dos genótipos resistentes 'Ohio 8245' e 'Hawaii 7998' com os genótipos suscetíveis 'CNPH 401-08' e 'CNPH 416.81.01.02', em um esquema dialélico desconsiderando-se os recíprocos. Os resultados indicaram resistência quantitativa, com estimativa do número de genes variando de quatro a oito genes, indicando também modelo aditivo-dominante.

Por meio de uso dos métodos Genealógico e *Single Seed Descent* (SSD), Riva (2006) avançou gerações obtidas a partir de população segregante do cruzamento entre os acessos UENF 1421 (suscetível à mancha-bacteriana) e UENF 1381 (resistente à mancha-bacteriana), e

selecionou oito linhas superiores e resistentes.

2.4. Pungência

O gênero *Capsicum* possui um grupo cujos frutos são caracterizados pela presença de alcalóides que conferem pungência a seus frutos (pimentas) e outro grupo que não apresenta pungência (pimentões) (Bosland, 1996).

A característica ardida da pimenta, chamada pungência, é exclusiva desse gênero, sendo atribuída a um alcalóide, a capsaicina (EMBRAPA, 2007). Este princípio ativo, pertencente a um complexo de metabólitos secundários denominados capsaicinóides (capsaicina, diidrocapsaicina, norcapsaicina, nordiidrocapsaicina, nornordiidrocapsaicina, homocapsaicina e homodiidrocapsaicina), é um alcalóide cristalino produzido por glândulas localizadas na junção da placenta com a parede do fruto, sendo mais concentrado no tecido placentário. Os destaques são para capsaicina e diidrocapsaicina, as quais ocorrem em maiores quantidades (Bosland, 1996).

Desde a década de 90, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de se estudar o controle genético dos níveis de pungência nos frutos de *Capsicum*. Entretanto, o volume de trabalhos apresentados é muito reduzido e outros apresentam muita controvérsia (Wagner, 2003). Segundo Harvell e Bosland (1997), a pungência presente em *C. annuum* L. é determinada por um gene dominante (*C*), e sua ausência pelo gene recessivo (*c*). Pesquisas envolvendo estudos moleculares foram realizadas no gênero, possibilitando a identificação deste gene no cromossomo 2 (Blum et al., 2002; Lefebvre et al., 2002).

Com o objetivo de determinar a herança da pungência em *Capsicum chinense*, Ribeiro (1997) baseou-se no método de injeção-extração para rápida determinação do total de capsaicinóides em frutos. Essa metodologia foi eficaz na distinção de frutos com diferentes conteúdos de capsaicina ao indicar considerável variabilidade entre as 17 introduções amostradas, revelando que a herança da pungência sugere dominância parcial, sendo predominantemente de natureza aditiva.

Um método adequado para determinar a pungência de pimentas utilizando alta tecnologia é o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ou CLAE (Cromatografia Líquida de alta eficiência). Esse método visa dissolver uma amostra de pimentas moídas em etanol saturado com acetato de sódio, para separar os capsaicinóides. Estes são analisados com um espectrofluorímetro, que

mede o nível de capsaicina em partes por milhão (ppm), os quais são, então, convertidos para S.U. (*Scoville Unit*), medida padrão usada pela indústria alimentícia. Entretanto, esse método é bastante oneroso e trabalhoso, principalmente porque necessita de preparo prévio do material (Filho, 2006).

Visando investigar a base genética e a variabilidade de uma população segregante de *Capsicum* em relação à pungência e alguns caracteres do fruto, Wagner (2003) avaliou dois genitores homozigóticos contrastantes para a pungência bem como as respectivas gerações F₁, RC₁₁ e progênes F_{4:3}, por meio de métodos sensoriais e processo cromatográfico (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE). Os dados indicaram que o caráter, possivelmente, é controlado por dois locos epistáticos duplo-dominantes (9 pungentes; 7 doces em F₂) e genes modificadores. A seleção para aumento da pungência deverá ocasionar redução na produtividade, sendo a recíproca também verdadeira, e a avaliação por método cromatográfico foi 30% mais eficiente que o método sensorial.

Noventa acessos de *Capsicum* foram avaliados para o conteúdo de capsaicinóides, pela técnica de detecção dos níveis de nitrogênio e fósforo por meio da cromatografia gasosa (GC/NPD). Os resultados indicaram que a capsaicina é um dos capsaicinóides mais atuantes, sendo que suas concentrações são as mais altas dentre todos os capsaicinóides. A análise estatística revelou que o acesso PI 441642 (*C. chinense*) teve a maior concentração de capsaicinóides, o acesso PI 497984 (*C. frutescens*) apresentou o maior valor de diidrocapsaicina, já os acessos PI 439522 (*C. frutescens*) e PI-497984 tiveram as concentrações mais altas de capsaicinóides totais (Jarret e Antonious, 2006).

Derera (2000) mostrou que um método simples qualitativo é suficiente para identificar a presença da capsaicina. Em seus estudos com *Capsicum*, utilizando tecidos de placenta dos frutos em reação com vanadato de amônio e ácido clorídrico, o pesquisador relatou que esse teste qualitativo indicou com eficiência a presença ou a ausência da capsaicina.

Apesar da pequena quantidade de trabalhos realizados no estudo da herança genética da pungência, Wagner (2003) alerta para o fato de que, nos trabalhos mais antigos, a quantificação da pungência era feita por meio de análises sensoriais, o que acarretava possíveis erros; e, com o uso de técnicas mais refinadas como espectrofotometria e cromatografia, há maior precisão nos

resultados. Deste modo, o confronto de dados antigos e atuais revela um desencontro nas informações obtidas.

2.5. Seleção assistida por marcadores moleculares

A década de 90 apresentou grandes avanços na área da biotecnologia, sobretudo com o uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas e na caracterização molecular de cultivares e linhagens, favorecendo o melhorista na escolha do método mais adequado para sua pesquisa (Leonardo et al., 2000).

Os marcadores moleculares são ferramentas que possibilitam diferenciar dois ou mais indivíduos, ou seja, todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma vez detectados os marcadores ligados a uma determinada característica de interesse, é possível selecionar os indivíduos com base no fenótipo do marcador. Esse tipo de abordagem é conhecido como seleção assistida por marcadores (SAM). Esta técnica é de extrema importância quando a característica de interesse é de avaliação difícil e cara, proporcionando redução no tempo e nos custos de programas de melhoramento (Alzate-Marin et al., 2005).

Neste aspecto, a biotecnologia oferece uma gama de possibilidades ao melhoramento de plantas por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD, AFLP, SSR e microssatélites, entre outros. Estes também podem ser utilizados para geração de mapeamento genético, associação a características agrônômicas de interesse, identificação de QTLs, caracterização de germoplasma, reconstituição de genealogias (filogenia), identificação de cultivares e porta-enxertos, proteção intelectual, determinação de paternidade, clonagem, engenharia genética, entre outros (Revers, 2006).

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade de DNA quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, ao custo, à facilidade de uso, à consistência e à repetibilidade. Alguns dos marcadores utilizados são RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Ferreira, 2003).

O RFLP tem como base a hibridização de uma seqüência clonada com fragmentos de seqüência homóloga, distribuída ao longo do genoma, tornando-a apropriada para estudo cujo conceito básico é de que as bandas observadas em uma mesma posição do gel possuem seqüências homólogas de nucleotídeos (Ferreira, 2003). Esse tipo de marcador cobre todo o genoma do organismo, aumenta a probabilidade de associação significativa entre marcadores e genes; possui expressão co-dominante, diferenciando heterozigotos e homozigotos, o que gera maior informação genética e permite uma análise detalhada da ação gênica e interação entre alelos em estudos de mapeamento e características qualitativas. Por outro lado, pode ser limitado por exigir mão-de-obra qualificada e automatização, instalações adequadas e dejetos de material radioativo, neste caso o uso de fósforo-32, e a obtenção de biblioteca de sondas, o que requer alguns meses (Parrella et al., 2002).

A análise de AFLP consiste na clivagem do DNA genômico do indivíduo por duas enzimas de restrição; em seguida, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos, ocorrendo amplificação seletiva por meio de iniciadores específicos. Posteriormente, os fragmentos amplificados são separados em gel de alta resolução. Os marcadores AFLP apresentam dominância, não sendo possível a detecção de heterozigotos, custo elevado e maior número de etapas e cuidados. Entretanto, o grande número de fragmentos gerados proporciona uma amostragem ampla e simultânea, com grande poder de detecção de variabilidade genética; apresenta maior robustez quando comparado com RAPD por utilizar iniciadores mais longos, aumentando a especificidade da amplificação e a competição, que ocorre durante a amplificação (Ferreira, 2003).

O RAPD é uma técnica que permite a ampliação de fragmentos de DNA delimitados por iniciadores (10 pares de bases) com seqüências arbitrárias, os quais hibridizam em seqüências complementares distribuídas ao acaso no DNA (Ceruti e Lazzari, 2003). O polimorfismo produzido pela técnica de RAPD aparece sob a forma de presença ou ausência de fragmentos revelados em um gel. Outra característica importante é que esse tipo de marcador é herdado como marcador dominante, portanto não diferencia indivíduos heterozigotos e homozigotos dominantes (Sabatini, 2003). Esta técnica não necessita de informação prévia sobre seqüências de DNA e oferece grande disponibilidade de iniciadores, rapidez e custo mais baixo que outras técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia de Polimerase). Porém, algumas desvantagens

existem, como marcadores dominantes e falta de reprodutibilidade se as condições da reação não forem otimizadas ou se problemas de contaminação não forem resolvidos (Ceruti e Lazzari, 2003).

No melhoramento de plantas, o estudo sobre a herança da resistência a doenças é essencial, e o uso de marcadores moleculares associados aos genes de resistência requer sua identificação prévia. Deste modo, análises de polimorfismo de DNA com marcadores do tipo RAPD vêm sendo amplamente utilizadas na identificação e seleção eficiente dos genótipos que carregam combinações específicas de genes de resistência (Corrêa et al., 2001).

Marin et al. (2003), visando avaliar herança da resistência à antracnose na cultivar de feijoeiro comum Cornell 49-242, obtiveram resultados que indicaram a presença de três genes dominantes, sendo dois de caráter complementar, os quais controlam a resistência ao patótipo 81 de *C. lindemuthianum*, enquanto que um gene dominante e um recessivo controlam a resistência ao patótipo 65. O uso de marcadores RAPD possibilitou selecionar linhagens F_{2:3} resistentes à antracnose, por meio do marcador denominado OPQ04_{1440C}, ligado ao gene de resistência Co-2.

Por meio de análise molecular, via PCR, José et al. (2005) testaram 15 iniciadores em população F₂ obtida do cruzamento entre dois acessos silvestres de amendoim, contrastantes para resistência a patógenos da cultura. Os resultados permitiram a obtenção de 60 bandas, das quais 30 foram seqüenciadas e adicionadas a um mapa recém-construído, favorecendo a correlação com resistência a patógenos para os quais os genitores contrastam, e beneficiando sua utilização em programas de melhoramento do amendoim.

Corrêa et al. (2001), em estudo da herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores RAPD flanqueando o loco de resistência, relataram que a resistência proveniente de indivíduos do grupo ouro negro (ON) é conferida por um gene dominante enquanto que os do grupo PT (US Pinto 111), por um recessivo. Também foi verificado que os marcadores OPM02_{460C} e OPAA19_{600C} estão a, respectivamente, 5,3 e 10 centimorgans (cM) do loco de resistência proveniente de ON. Eles flanqueiam este loco e, quando empregados simultaneamente, proporcionam uma eficiência de seleção de 97,4%. Não foram identificados marcadores para o loco de resistência proveniente de PT.

A identificação de marcadores ligados ao gene de resistência à mancha-

angular em feijão (raça 63.39 de *P. griseola*), provenientes das populações derivadas dos cruzamentos entre Rudá (genitor suscetível) e MAR-2 (genitor resistente), foi realizada por meio da técnica de RAPD, utilizando-se 400 iniciadores, dos quais apenas nove apresentaram-se heteromórficos. Destes, o iniciador OPE-04 amplificou uma banda de aproximadamente 500 pb, a qual esteve presente em todos os indivíduos resistentes e ausente em todos os suscetíveis, seguindo a segregação na proporção 3:1 (em uma população F₂ constituída de 158 plantas) (Ferreira et al., 1999).

Com o objetivo de desenvolver um mapa genético para *Capsicum annuum*, por meio de marcadores microssatélites, com avaliação fenotípica para resistência à murcha de fitófitor e ao mosaico PepYMV, Marques et al. (2005) avaliaram 186 indivíduos F₂ provenientes de indivíduos contrastantes para as referidas doenças, utilizando 275 iniciadores, dos quais 50 apresentaram polimorfismo e somente 37 foram utilizados para configuração do mapa.

Trabalhando com feijão, Alzate-Marin (2003) estudou a variabilidade genética de 21 cultivares-elite, caracterizados por marcadores moleculares RAPD. Esse trabalho possibilitou relacionar os genótipos em três grupos e inferir a utilização de genitores empregados na obtenção de híbridos melhorados.

Visando à identificação de possíveis genes de resistência em *Arabidopsis thaliana*, com a finalidade de isolá-los e utilizados em programas de melhoramento para controle de *Ralstonia solanacearum*, Magalhães et al. (2005) avaliaram 28 ecotipos e, após seleção dos resistentes, foi feita análise molecular com 71 marcadores moleculares SSLP, destacando-se seis, os quais serão utilizados em futuros programas envolvendo populações segregantes da espécie.

O perfil da expressão de resistência do acesso V10309 de *Arachis stenosperma* (amendoim silvestre), inoculado com a ferrugem e mancha preta, foi avaliado por meio da técnica de AFLP, utilizando-se oito iniciadores, os quais proporcionaram a formação de 96 bandas polimórficas, sendo que cinco destas, após reamplificação e seqüenciamento, mostraram-se envolvidas no processo de resistência (Guedes et al., 2005).

A resistência contra vírus detectados em batata e tabaco foi identificada em tomate silvestre (PI247087 - *Lycopersicon hirsutum*). Análises de segregantes F₂, F₃ e RC₁ indicaram um único gene recessivo envolvido na resistência. Por meio de marcadores AFLP, foi possível mapear este gene, o qual apresentou

semelhanças com genes presentes em pimenta (*Capsicum* spp.) (Parrella et al., 2002).

Um mapa genético de *Capsicum* foi construído baseado na análise de seis populações mapeadas independentemente. Dados de segregação foram obtidos utilizando-se 2.262 marcadores moleculares, sendo 1.528 AFLP, 440 RFLP, 288 RAPD, algumas regiões de genes já conhecidos, isoenzimas e marcadores morfológicos, obtidos de características fenotípicas da análise de cruzamentos intra e interespecíficos. Os seis mapas foram integrados por meio do uso de cerca de 200 marcadores comuns. O mapa genético resultante consiste em aproximadamente 2.000 marcadores distribuídos nos 12 cromossomos de *Capsicum*. Esta alta densidade genética do mapa, combinada com a informação dos marcadores de diferentes origens, indica boas perspectivas para novos estudos genéticos e aplicações no melhoramento assistido por marcadores em *Capsicum* (Paran et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e características da área experimental

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação localizada na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (UENF/CCTA), Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), situada a 21° 45' de latitude sul, 41° 18' de longitude oeste e 11 metros de altitude, no município de Campos dos Goytacazes, norte do Estado do Rio de Janeiro.

3.2. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas as gerações F₁, F₂ e F₃ obtidas a partir do cruzamento entre o acesso UENF 1381 (P₁) e a variedade *Early California Wonder*, também conhecida como ECW (P₂) (Figura 1).

O acesso UENF 1381 é de uma pimenta da espécie *Capsicum annuum* L. que possui pungência; foi identificado como resistente às raças P3 (Costa, 2000; Sudré, 2003) e P6 (R. Rodrigues, comunicação pessoal) e vem sendo utilizado em programa de melhoramento do pimentão para resistência à mancha bacteriana na UENF (Costa et al., 2002; Riva et al., 2004; Riva, 2006). A resistência à raça P6 foi identificada em parceria entre a UENF e a *University of*

Florida. Além da pungência e da resistência, o acesso UENF 1381 caracteriza-se por possuir plantas com caule verde, hábito de crescimento ereto, cor do fruto verde em estágio intermediário e vermelho em estágio maduro, epiderme lisa, semente de cor palha e fruto alongado com presença de dois lóculos.

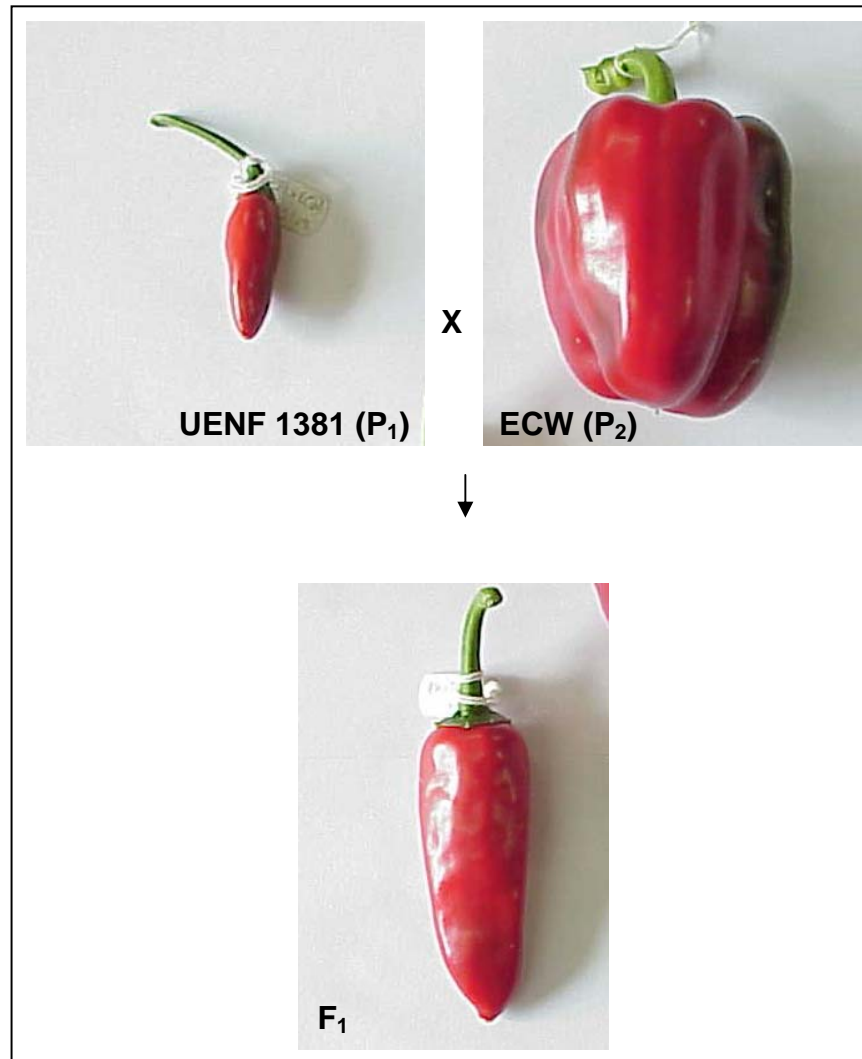


Figura 1 – Frutos produzidos por UENF 1381 (P_1), ECW (P_2) e pelo híbrido F_1 do cruzamento entre $P_1 \times P_2$.

A variedade ECW (*C. annuum*) foi escolhida como genitora por ser reconhecidamente suscetível à mancha-bacteriana (Wierzbick, 2003), não dispondo de nenhum dos cinco genes já identificados para a resistência a esta doença (*Bs1*, *Bs2*, *Bs3*, *bs5* e *bs6*). Essa variedade foi inclusive utilizada em um programa de melhoramento que, baseado no método do retrocruzamento, deu origem às três linhas quase-isogênicas denominadas ECW-10R, ECW-20R e

ECW-30R, cada uma contendo, respectivamente, os genes *Bs1*, *Bs2* e *Bs3* (Kousik e Ritchie, 1999), sendo utilizadas em todo o mundo como diferenciadoras das raças existentes.

A ECW é, portanto, amplamente conhecida pelos pesquisadores como suscetível a todas as raças até então descritas. Suas plantas apresentam, em média, 65 cm de altura; frutos com cerca de 8 cm de comprimento, do tipo quadrado, verdes quando imaturos e vermelhos quando maduros; e pequeno número de sementes por fruto quando produzidas nas nossas condições, o que dificulta a produção de sementes híbridas.

No início deste trabalho, havia a disponibilidade de sementes de UENF 1381 (acesso mantido regularmente na coleção de germoplasma de *Capsicum* spp. da UENF), de ECW (em número restrito, cerca de 100), F₁ (200 sementes) e F₂ (cerca de 100 sementes), sendo que as sementes F₁ e F₂ foram obtidas em cruzamentos realizados na *University of Florida* (R. Rodrigues e R. E. Stall, dados não-publicados). Dados preliminares indicaram a presença de um gene dominante controlando a resistência, e, considerando-se que a obtenção de mais sementes F₂ implicaria um atraso de cinco a seis meses para o início das avaliações e colheita do material para a análise molecular, optou-se por fazer a avaliação da resistência em duas etapas. Na primeira etapa, além da avaliação, foram obtidas mais sementes F₁, F₂ e também das gerações F₃, RC₁ e RC₂, o que permitiria uma confirmação ou não da resistência observada nos indivíduos F₂ e o estudo da herança baseado na análise de gerações.

Para obtenção das sementes F₃, as flores de plantas F₂ foram cobertas com sacos de papel antes da antese. Após o pegamento dos frutos, os sacos foram retirados, e os frutos desenvolveram-se normalmente até a maturação, quando foram colhidos e suas sementes extraídas manualmente. A coleta e o armazenamento dos frutos foram realizados de forma individualizada (Figura 2), e suas sementes foram extraídas e secas em temperatura ambiente nas condições de laboratório. Após a secagem (2-3 dias), as sementes F₃ foram acondicionadas em embalagens apropriadas e mantidas em geladeira (5 °C).

Foram realizados retrocruzamentos entre os indivíduos F₁ e os genitores. O procedimento consistiu de emasculação do botão floral do indivíduo receptor de pólen, utilizando-se pinça reta de ponta fina. Para tanto, os estames foram removidos, deixando o estigma apropriado para a polinização. O fornecimento de pólen foi feito por flores adequadamente protegidas e já abertas, colhidas dos

indivíduos F_1 . Após a transferência de pólen ao estigma do genitor feminino, o botão foi novamente fechado e protegido com saco de papel e fita adesiva, de modo que não afetasse seu desenvolvimento. Por fim, foi colocada etiqueta na flor, com identificação do cruzamento.



Figura 2 – Frutos F_2 (geração proveniente do cruzamento entre UENF 1381 x ECW) coletados e armazenados para extração de sementes.

A polinização artificial foi realizada pela manhã, até às 10 horas, e a tarde, a partir das 16 horas, na busca de se obter maior eficiência e evitar que os botões sofressem algum dano com o calor. As flores utilizadas como doadoras de pólen foram coletadas no mesmo dia da polinização, sendo estas escolhidas devidamente, conforme coloração intensa e aspecto sadio, sem sinais de murchamento. Os botões receptores de pólen foram escolhidos intencionalmente com aspecto encorpado e totalmente fechados. Em todas as polinizações, procurou-se evitar danos aos botões, estigmas e estiletes no momento da hibridação.

A semeadura foi efetuada em bandejas de poliestireno com 128 células, contendo substrato organovegetal (Plantmax[®]) e, após a formação de dois pares de folhas verdadeiras, as mudas foram transferidas para vasos plásticos com volume de 5 litros, contendo mistura de solo:esterco-bovino:areia na proporção 2:2:1. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente

casualizado, e os tratos culturais foram seguidos conforme recomendações feitas por Filgueira (2000).

3.3. Herança da resistência à mancha-bacteriana

Os experimentos para avaliação da resistência foram conduzidos em duas etapas. O primeiro (Figura 3) teve início em março de 2005, com avaliação de dez indivíduos de cada uma das gerações P_1 e P_2 , 20 indivíduos F_1 e 100 indivíduos F_2 . O transplântio ocorreu 17 dias após a germinação, sendo a inoculação realizada 50 dias após a semeadura. Nesta primeira etapa, foram realizadas avaliações individuais das raças P3 e P6 em todas as plantas, devido ao conhecimento da resistência do genitor feminino (UENF 1381) às duas raças. Deste modo, pôde-se selecionar e estudar plantas F_2 resistentes somente à raça P6, sem nenhuma interferência possivelmente advinda da resistência à raça P3. Após esta avaliação, foram identificados 28 indivíduos F_2 resistentes exclusivamente à raça P6, objetivo principal do trabalho, os quais foram selecionados para condução de um segundo experimento envolvendo linhas F_3 .

O segundo experimento (Figura 4), envolvendo apenas a raça P6, teve início em maio de 2006, com avaliação de dez indivíduos de cada uma das gerações P_1 , P_2 e F_1 , 40 indivíduos F_2 e 28 linhas F_3 resistentes exclusivamente à raça P6, selecionadas previamente no primeiro experimento, com 10 repetições cada uma. O transplântio ocorreu 18 dias após a germinação, com inoculação realizada 50 dias após a semeadura.

A raça P6, para sua melhor conservação, foi acondicionada em frascos de vidro contendo água estéril e mantida à temperatura ambiente. Com a finalidade de realizar a inoculação em folhas, a suspensão bacteriana foi transferida, por meio de alça de platina, para placas de Petri contendo meio DYGS sólido (Rodrigues Neto et al., 1986) e crescida em estufa bacteriológica a 28 °C por um período de 48 horas. Após este período, as colônias bacterianas foram suspensas em água estéril e sua concentração de células foi ajustada para 10^8 ufc/ml, por meio de espectrofotômetro, com comprimento de onda de 600 nm e 0,3 de absorbância (Aguiar et al., 2003). Em seguida, foi realizada diluição seriada, obtendo uma concentração final de 10^5 ufc/ml, a qual foi preparada previamente para cada um dos experimentos. O mesmo procedimento foi realizado para a raça P3 utilizada no primeiro experimento.



Figura 3 – Vista parcial do experimento de avaliação da resistência à mancha-bacteriana, em casa de vegetação, envolvendo indivíduos UENF 1381, ECW, F₁ e F₂, em março de 2005.



Figura 4 – Vista geral do experimento de avaliação da resistência à mancha-bacteriana, em casa de vegetação, envolvendo indivíduos UENF 1381, ECW, F₁, F₂ e F₃, realizado em maio de 2006.

Nos dois experimentos, as inoculações foram realizadas em folhas jovens, saudáveis e totalmente expandidas do terço médio da planta, por meio de infiltração da suspensão bacteriana no mesófilo foliar, com auxílio de seringa

hipodérmica (Figura 5), proporcionando o encharcamento de, aproximadamente, 1,0 cm² (Bongiolo Neto et al., 1986; Costa, 2000; Juhász, 2002; Sudré, 2003; Riva et al., 2004; Riva, 2006).

As avaliações das folhas inoculadas obedeceram a uma escala de notas com variação de valores de 1 a 5, conforme Riva (2006). Neste procedimento, foram conferidas notas 1 e 2 às plantas resistentes e notas 3, 4 e 5 às suscetíveis, sendo que os valores intermediários foram relacionados com a menor ou maior severidade da doença. As plantas classificadas com nota 1 corresponderam àquelas que não apresentaram nenhum sinal de infecção na área inoculada da folha. Já as plantas com pequeno sinal de amarelecimento, porém sem traços fortes de infecção, foram registradas com a nota 2. Para as plantas consideradas suscetíveis, a nota 3 correspondeu a um amarelecimento mais característico, delimitando a área infiltrada; a nota 4 registrou as regiões de infecção com presença de amarelecimento acompanhado de pequena necrose; e as plantas classificadas com nota 5 apresentaram necrose generalizada na área de infecção ou completa queda da folha inoculada.

O período de acompanhamento da progressão da doença iniciou-se no quinto dia após a inoculação, sendo feita uma nova avaliação a cada dois dias, até o décimo terceiro dia, perfazendo um total de cinco avaliações.

Foi observado o número total de plantas resistentes e suscetíveis, podendo-se inferir a respeito da herança da resistência por meio de análises estatísticas.

Ainda com relação à classificação por meio de notas, foi possível realizar o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) via *software* AVACPD (Torres e Ventura, 1991).

Posteriormente, com a obtenção dos dados da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a discriminação da variação entre genótipos foi feita pelo teste de médias por Scott-Knott a 1% de probabilidade, utilizando o *software* GENES (Cruz, 2006).



Figura 5 – Inoculação da bactéria via seringa hipodérmica.

3.4. Características agronômicas avaliadas

Com a finalidade de avaliar as características agronômicas presentes nas gerações testadas, foram consideradas as seguintes características quantitativas:

✓ Peso médio de frutos (PMF) – obtido por meio de balança digital de precisão, pela divisão entre o peso total de frutos colhidos em cada planta e o respectivo número total de frutos, expresso em gramas (g).

✓ Comprimento médio de frutos (CMF) – obtido pela quantificação do maior comprimento longitudinal dos frutos, com auxílio de paquímetro digital, em uma amostra de 10 frutos por planta, sendo expresso em milímetros (mm).

✓ Diâmetro médio de frutos (DMF) – obtido pela medição do diâmetro de frutos, com auxílio de paquímetro digital, em uma amostra de 10 frutos por planta, sendo expresso em milímetros (mm).

3.5. Análise da pungência

A herança da pungência foi estudada nos dois experimentos estabelecidos neste trabalho, com base na avaliação de três frutos de cada um dos indivíduos.

Os frutos maduros foram coletados e submetidos a uma análise qualitativa, que determinou a presença ou ausência da pungência, devido à reação de substâncias presentes na placenta com o vanadato de amônio, conforme descrito por Derera (2000).

O teste consistiu no preparo de uma solução contendo 100 ml de vanadato de amônio (1,0 grama de vanadato de amônio dissolvido em 100 ml de água destilada) e 15 ml de ácido clorídrico. Após este preparo foram adicionados 15 ml da solução em um tubo de ensaio contendo fragmentos de placenta e deixado em repouso por cerca de 14 horas. A reação proporcionou visualização das glândulas presentes no tecido da placenta que contêm capsaicina, as quais ficam caracterizadas por uma coloração castanha.

3.6. Análise molecular por marcadores RAPD

Para a análise molecular, foram coletados, aproximadamente, 3,0 gramas de folhas jovens, tenras e sadias de todos os indivíduos estabelecidos no primeiro experimento, ou seja, folhas de P₁, P₂, F₁ e F₂. As folhas foram coletadas e acondicionadas em papel alumínio, identificadas e depositadas em isopor contendo nitrogênio líquido, com a finalidade de preservar a integridade do material. Posteriormente, estas foram armazenadas em laboratório em biofreezer a -70 °C.

A extração de DNA genômico de cada indivíduo foi realizada conforme o método descrito por Doyle e Doyle (1990). Cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó, sendo 200 a 300 mg deste pó transferidos para microtubos “ependorf” de 2,0 ml, devidamente identificados. Os tubos foram, em seguida, armazenados em biofreezer (-70 °C). No início da etapa de extração, foi adicionado o volume de 1,2 ml de tampão de extração (CTAB 5%; NaCl 5 M; EDTA 0,5 M; Tris-HCl 1,0 M pH 8,0; H₂O; β-Mercaptoetanol a 0,1% e polivinilpirrolidona a 1,0%) a cada tubo.

Os microtubos foram dispostos em suportes e incubados em banho-maria a 65 °C por 40 minutos. Durante a incubação, os tubos foram suavemente agitados (invertidos manualmente) a cada dez minutos e, em seguida, foram resfriados à temperatura ambiente e centrifugados a 14.000 g por cinco minutos, transferindo-se o sobrenadante, aproximadamente 0,9 ml, para microtubos de 1,5 ml já identificados. Após a transferência do sobrenadante, foi efetuada a desproteinização por meio da adição de 0,8 ml de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) a cada tubo, agitando-os suavemente por dez minutos e promovendo uma nova centrifugação.

Novamente o sobrenadante, cerca de 0,75 ml, foi transferido para novos tubos de 1,5 ml e adicionados a eles 0,8 ml de clorofórmio-álcool isoamílico

(24:1), procedendo-se a uma nova centrifugação. Após esta etapa, a fase superior, aproximadamente 0,6 ml, foi transferida para novos tubos de 1,5 ml e adicionados a eles 2/3 do volume de isopropanol gelado, promovendo a precipitação dos ácidos nucléicos. Os tubos foram invertidos suavemente algumas vezes, e incubados a -20 °C por três horas. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por dez minutos a 14.000 g, promovendo a formação de um precipitado branco no fundo de cada tubo. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com etanol a 70% e uma vez com etanol a 95%.

Em seguida, o material ficou exposto à temperatura ambiente por 20 minutos para secar, sendo ressuspenso em 0,25 ml de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 40 µg/ml. Após a ressuspensão, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, foi adicionado a elas NaCl a 5 M, na proporção de 1:10 (NaCl:DNA ressuspenso), e adicionados 2/3 do volume de isopropanol gelado para precipitar o DNA novamente.

O material extraído foi incubado em geladeira a 4 °C durante a noite. Posteriormente, as lavagens com etanol a 70% e a 95% foram repetidas e o precipitado final foi ressuspenso em 0,2 ml de TE, repousando durante 4 horas. O DNA foi quantificado com amostras de concentrações de 20, 40 e 80 ng/µL em gel de agarose 0,8% corado com brometo, por meio da reflexão de luz ultravioleta.

3.6.1. Seleção de iniciadores

Após a quantificação de DNA das amostras, estas foram ajustadas para a concentração de 10 ng/µL cada uma. Em seguida, prepararam-se os coquetéis de reagentes (água Milli-Q, tampão PCR 10X, MG Cl₂ 25 mM, dNTPs, iniciador, Taq DNA Polimerase e DNA), para realizar a reação de PCR.

Para uma análise inicial, foram selecionados cinco indivíduos F₂ caracterizados com presença de capsaicina e variação de notas de 1 a 5 para resistência à mancha bacteriana, e outros cinco sem a presença do alcalóide e mesma variação de notas. Esses indivíduos, associados aos pais (UENF 1381 e ECW), indivíduo F₁ e o teste branco totalizaram 14 amostras analisadas em termociclador com 96 poços, possibilitando o uso de seis iniciadores por vez. Deste modo, a análise foi realizada, numa primeira etapa, com a finalidade de selecionar os iniciadores que geravam bandas polimórficas entre as 14 amostras.

O DNA dos pais, F₁, indivíduos F₂ resistentes e suscetíveis e uma

amostra em branco foram amplificados via técnica de RAPD, utilizando-se 138 iniciadores *Operon Technologies* e 320 iniciadores *Gibco*, em termociclador, por aproximadamente 4,5 horas. Encerrada a amplificação, os fragmentos de DNA foram corados e submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,2% submerso em tampão TAE 0,5X a 80 volts por três horas, com finalidade de separar as bandas obtidas. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e as imagens fotodocumentadas pelo sistema “Eagle Eye”.

Diante da revelação do gel, foram identificados os iniciadores polimórficos entre os genitores, F_1 e indivíduos F_2 resistentes e suscetíveis, indicando a presença ou ausência de determinadas bandas. Após a seleção dos iniciadores que apresentavam as melhores bandas polimórficas para os genitores, todo o método foi novamente realizado, utilizando-se a população F_2 .

3.7. Análises estatísticas

3.7.1. Análise de variância

Os dados fenotípicos com base em notas para resistência, bem como os obtidos para as características agrônômicas foram analisados em 28 linhas F_3 com auxílio dos programas GENES (Cruz, 2006) e AVACPD (Torres e Ventura, 1991), sendo utilizado o modelo de delineamento experimental inteiramente casualizado, definido por:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij}, \text{ em que:}$$

Y_{ij} = valor observado, relativo ao i -ésimo genótipo na j -ésima repetição;

μ = média geral;

G_i = efeito fixo atribuído ao i -ésimo tratamento ($i = 1, 2, 3, \dots, g$), sendo o número de tratamentos equivalente às 28 linhas F_3 previamente selecionadas para resistência à raça P6;

E_{ij} = erro experimental atribuído à observação Y_{ij} .

A partir dos dados de cada tratamento, foi realizada a análise de variância, conforme apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 – Esquema de análise de variância

| FV | GL | QM | E(QM) | F |
|----------|------------|-----|---------------------|-------------|
| Genótipo | $g - 1$ | QMG | $\sigma^2 + \Phi g$ | QMG / QMR |
| Resíduo | $(b - 1)g$ | QMR | σ^2 | |
| Total | $bg - 1$ | | | |

Sendo:

g = número de gerações;

b = número de repetições;

σ^2 = variância do erro experimental;

Φg = componente quadrático que expressa a variabilidade entre as gerações (efeito fixo).

Os parâmetros genéticos das 28 linhas F_3 foram estimados pelas seguintes expressões matemáticas:

✓ Variância fenotípica: expressa pela relação entre o quadrado médio do genótipo (QMG) e o número de repetições (b):

$$\sigma_f^2 = \frac{QMG}{b}$$

✓ Variância ambiental: é a relação entre o quadrado médio do resíduo (QMR) e o número de repetições (b):

$$\sigma_e^2 = \frac{QMR}{b}$$

✓ Variabilidade genotípica: obtida pela expressão:

$$\Phi_G = \frac{QMG - QMR}{b}$$

✓ Coeficiente de determinação genotípica: obtido pela razão entre os estimadores da variabilidade genotípica e da variância fenotípica:

$$H^2 = \frac{\Phi_G}{\sigma_f^2}$$

✓ Coeficiente de variação genotípica: obtido pela expressão:

$$CV_G = \frac{100\sqrt{\Phi_G}}{\hat{m}}$$

✓ Índice de variação: é a relação entre o coeficiente de variação genotípica (CV_G) e o coeficiente de variação experimental (CV_E), isto é:

$$I_V = \frac{CV_G}{CV_E} = \sqrt{\frac{\hat{\Phi}_G}{QMR}}$$

3.7.2. Comparação entre as médias

Foi realizada comparação entre médias pelo método proposto por Scott Knott (1974), em nível de significância de 1% de probabilidade, comparando as médias obtidas entre as 28 linhas F_3 resistentes para reação à mancha bacteriana, por escala de notas e pelo método de AACPD, assim como para as características agrônômicas dos frutos.

3.7.3. Estimativa dos parâmetros genéticos com base na população F_2

Pela análise de gerações envolvendo P_1 , P_2 , F_1 e F_2 , foi possível obter melhor conhecimento da estrutura genética dos indivíduos avaliados a partir das estimativas dos seguintes parâmetros:

✓ Variância fenotípica (σ_f^2): corresponde à variância obtida na geração F_2 :

$$\sigma_f^2 = \sigma_{F_2}^2$$

✓ Variância ambiental (σ_e^2): equivale à variância observada na geração F₁:

$$\sigma_e^2 = \sigma_{F_1}^2$$

✓ Variância genotípica (σ_g^2): estimada pela diferença entre variância fenotípica e ambiental:

$$\sigma_g^2 = \sigma_f^2 - \sigma_e^2$$

✓ Herdabilidade no sentido amplo (h_a^2): proporção da variância fenotípica atribuída a causas genéticas:

$$h_a^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_f^2}$$

✓ Grau médio de dominância (k): baseado nas médias dos genitores e da geração F₁:

$$gmd = k = \frac{2\bar{F}_1 - (\bar{P}_1 + \bar{P}_2)}{\bar{P}_1 - \bar{P}_2}$$

✓ Número mínimo de genes envolvidos na determinação do caráter (η):

$$\eta = \frac{R^2(1 + 0,5k^2)}{8\sigma_g^2}$$

Em que:

\bar{P}_1 = média da geração P₁ (UENF 1381);

\bar{P}_2 = média da geração P₂ (ECW);

\bar{F}_1 = média da geração F₁ (UENF 1381 x ECW);

R^2 = amplitude total na geração F₂.

3.7.4. Teste de qui-quadrado (χ^2)

Em relação às avaliações referentes à determinação da herança do caráter para a resistência à mancha-bacteriana e pungência, foi utilizado o método de qui-quadrado (χ^2), o qual possibilita ajustamento de freqüências observadas a proporções previstas por teorias ou hipóteses, como a segregação mendeliana. Essa análise foi realizada somente em relação à raça P6 em 84 plantas F₂ do primeiro experimento e 40 plantas F₂ do segundo experimento.

Nesse teste, a obtenção de valores significativos permite concluir que os dados não se ajustam com a hipótese formulada, qual seja, que a proporção de indivíduos F₂ observada é igual à proporção de indivíduos F₂ esperada. Valores não-significativos indicam que os dados concordam com a hipótese formulada (Pimentel-Gomes, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da resistência à mancha-bacteriana

No primeiro experimento, realizado em março de 2005, foram registrados os dados climatológicos referentes à temperatura e umidade relativa, pela Estação Agroclimatológica da UENF (Figuras 6 e 7).

A temperatura média durante o período de condução do experimento foi de 25,2 °C e a máxima de 31,3 °C, adequadas para o desenvolvimento da cultura, sendo que, no estádio de mudas, a melhor temperatura é de 26 °C a 30 °C, e o melhor crescimento é obtido com a temperatura de 27 °C (Pádua et al., 1984).

Na época da inoculação da bactéria, a temperatura máxima atingiu o valor médio de 30,8 °C, garantindo boa condição para o desenvolvimento da doença, pois alta umidade e temperaturas altas favorecem a mancha-bacteriana como a principal doença do pimentão (Kurozawa e Pavan, 1997).

A umidade relativa média manteve-se em torno de 81,87% durante os meses de condução do experimento. Na época de inoculação nas plantas, a umidade relativa média foi de 81,6%, sendo que a máxima alcançou o valor de 99,7% e a mínima permaneceu em 47,4%. A incidência e a severidade da mancha-bacteriana em pimentão estão associadas aos ambientes com temperatura e umidade elevadas (Noda et al., 2003).



Figura 6 – Temperatura média (T.méd.), máxima (T.máx.) e mínima (T.mín.) no período de fevereiro a agosto. Campos dos Goytacazes, 2005.

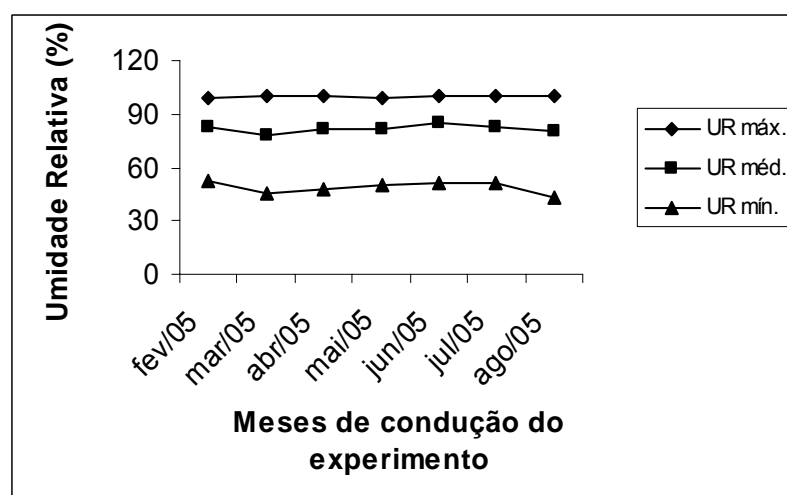


Figura 7 – Umidade relativa média (URméd.), máxima (URmáx.) e mínima (URmín.) no período de fevereiro a agosto. Campos dos Goytacazes, 2005.

Foi observada, pelos dados da Estação Agroclimatológica da UENF (Figuras 8 e 9), no segundo experimento, variação da temperatura e umidade relativa em relação ao ano anterior.

Durante o desenvolvimento da cultura, a temperatura média foi de 21,3 °C e a máxima de 27,2 °C, verificando-se uma pequena queda na temperatura em relação ao experimento anterior. Entretanto, esses dados não afetaram o desenvolvimento da cultura ou da bactéria, sendo que, no período de inoculação, a temperatura máxima atingiu o valor de 25,8 °C, com umidade relativa de 76,8%,

ou seja, uma combinação de fatores climáticos favoráveis ao desenvolvimento da cultura e à ocorrência da doença.



Figura 8 – Temperatura média (T.méd.), máxima (T.máx.) e mínima (T.mín.) no período de abril a outubro. Campos dos Goytacazes, 2006.

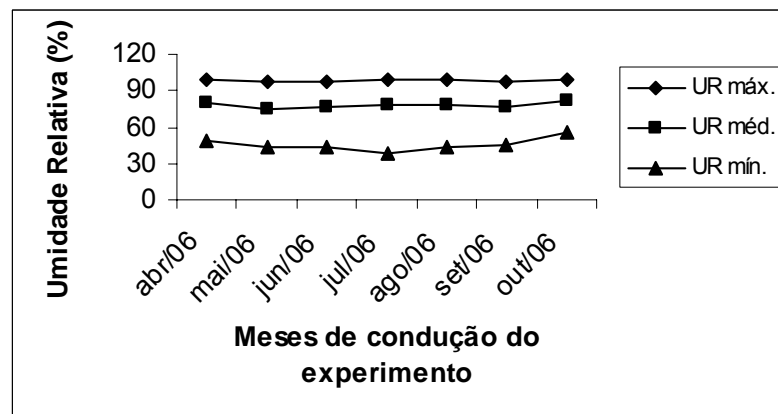


Figura 9 – Umidade relativa média (URméd.), máxima (URmáx.) e mínima (URmín.) no período de fevereiro a agosto. Campos dos Goytacazes, 2005.

Com a finalidade de confirmar a resistência à mancha-bacteriana observada nos indivíduos F_2 e a herança com base na análise de gerações, foram realizados retrocruzamentos envolvendo a transferência de pólen de indivíduos F_1 ao estigma dos genitores. No procedimento envolvendo o cruzamento entre o genitor UENF 1381 e F_1 (RC_1), foram obtidos frutos e, posteriormente, extração e armazenamento de sementes. Entretanto, no

procedimento para obtenção de frutos do cruzamento envolvendo *ECW* e F_1 (RC_2), foi verificada queda das flores após a transferência de pólen, fato que limitou o estudo da análise de gerações apenas de P_1 , P_2 , F_1 e F_2 .

Não se obteve sucesso na obtenção de sementes com os cruzamentos $ECW \times F_1$ e $F_1 \times ECW$, permitindo supor algum tipo de barreira de fertilização bidirecional. Torres e Buso (1999) afirmam que estas barreiras podem ocorrer antes da fertilização (denominadas barreiras pré-fertilização) ou após a fertilização (denominadas barreiras pós-fertilização).

As barreiras de pré-fertilização podem resultar na falta de germinação do grão de pólen e no retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico, impedindo a fertilização (Prestes e Goulart, 1995). Por outro lado, na ação de barreiras de pós-fertilização, a fertilização pode ocorrer, entretanto, o embrião híbrido aborta antes da maturidade devido a sua degeneração prematura, degeneração prematura do endosperma ou esterilidade total ou parcial das plantas híbridas (Van Creij et al., 1997).

Neste trabalho, foram realizados cruzamentos entre UENF 1381 x *ECW* e entre *ECW* x UENF 1381, sendo registrada a produção de sementes viáveis apenas no primeiro cruzamento. No estudo envolvendo o gênero *Capsicum*, vários pesquisadores vêm trabalhando com o intuito de identificar e transpor as barreiras de fertilização presentes em cruzamentos interespecíficos, visando à transferência de genes de importância econômica, de plantas silvestres para plantas cultivadas (Smith e Heiser, 1957; Siqueira et al., 1988; Pickersgill, 1997; Yoon et al., 2006). Entretanto, nos cruzamentos intraespecíficos ou entre indivíduos de espécies do mesmo complexo gênico, o germoplasma pode ser cruzado facilmente, resultando em híbridos com alta fertilidade.

Apesar de não pertencerem à mesma espécie, porém localizados no mesmo complexo, híbridos parcialmente férteis foram observados no cruzamento entre *C. frutescens* x *C. chinense* (Eshbaugh, 1964). No cruzamento entre as espécies *C. chinense* x *C. frutescens*, Casali (1970) observou a formação de frutos, porém não ocorreu germinação das sementes. No cruzamento entre as espécies *C. annuum* x *C. frutescens* e seus recíprocos, Campos (2006) obteve um total de 40 frutos, dos quais apenas nove foram viáveis. Para o cruzamento entre *C. frutescens* x *C. chinense*, esta autora obteve a formação de 32 frutos, entretanto 17 destes não apresentaram sementes viáveis e seis desenvolveram sementes aparentemente normais.

Os cruzamentos promovidos neste trabalho, envolvendo as combinações ECW x UENF 1381, ECW x F₁ e F₁ x ECW, foram realizados por meio de coleta manual de pólen e posterior contato do mesmo com o estigma das flores receptoras totalmente protegidas, sendo observada a formação de um pequeno fruto antes da sua queda. Neste caso, pode-se supor que um tipo de barreira pós-fertilização estivesse presente nos cruzamentos realizados. Entretanto, seria necessária uma avaliação mais aprofundada, envolvendo estudos reprodutivos com a finalidade de explorar o conhecimento das diferenças na constituição genética dentro da espécie bem como as informações a respeito da ocorrência dos possíveis efeitos de barreiras pré e pós-fertilização.

Algumas limitações presentes no desenvolvimento de híbridos no melhoramento de *Capsicum* devem-se a diversos fatores, destacando-se a incompatibilidade unilateral, viabilidade do grão de pólen, germinação e crescimento do tubo polínico, aborto após a fertilização, interações núcleo-citoplasma e macho esterilidade (Pickersgill, 1991; Souza et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Campos, 2006).

4.1.1. Herança da resistência com base em F₂

No primeiro experimento, das 100 sementes F₂ apenas 84 germinaram, as quais foram inoculadas individualmente com as raças P3 e P6 e avaliadas quanto à reação à mancha-bacteriana por meio de escala de notas (Figura 10). Os resultados relacionados com a raça P6 mostraram que 100% das plantas P₁ foram resistentes, 100% das plantas P₂ foram suscetíveis e 100% dos indivíduos F₁ testados foram resistentes, indicando que a dominância está envolvida no controle do caráter. A análise da geração F₂, envolvendo as duas raças, revelou 34 plantas resistentes a ambas as raças, apenas duas resistentes à raça P3, e 28 plantas apresentaram resistência exclusiva à raça P6. Portanto, para esta última raça, foi registrado um total de 62 plantas resistentes e 22 suscetíveis (Tabela 1), adequando-se à hipótese de 3:1 pelo teste do qui-quadrado (χ^2), que confirma a indicação preliminar de que um gene dominante controla a resistência à raça P6 no cruzamento estudado.

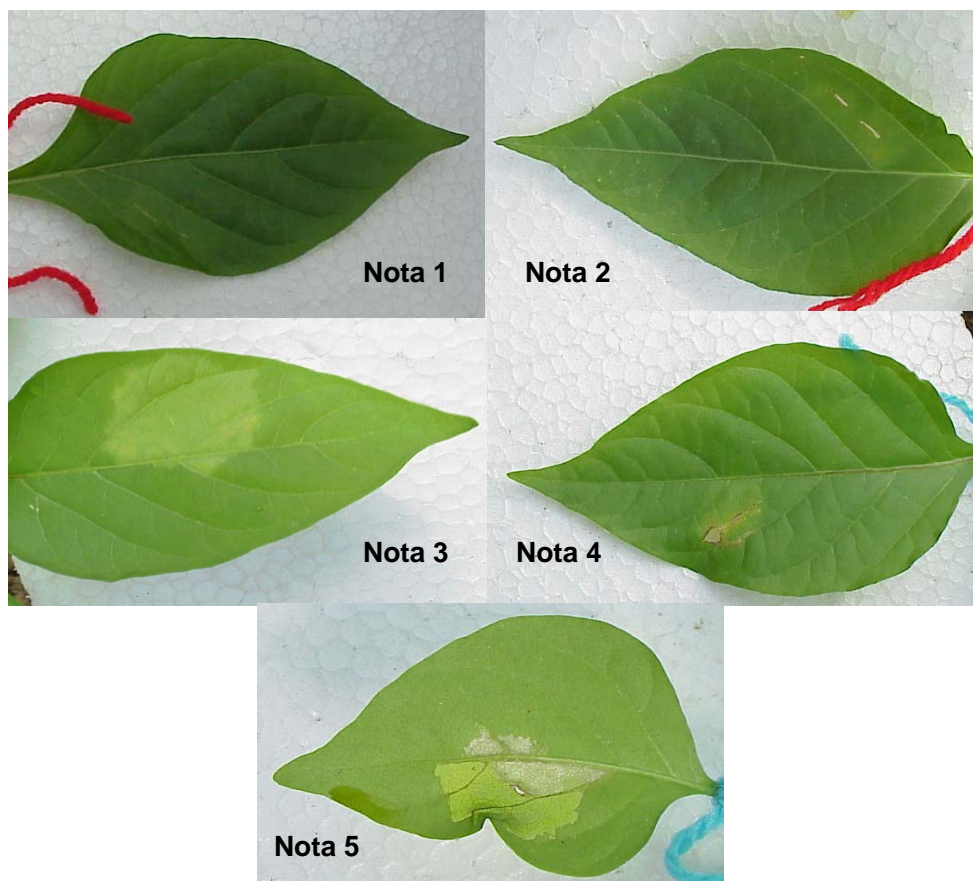


Figura 10 – Escala de notas para reação à mancha-bacteriana em *Capsicum annuum*, utilizada na avaliação das gerações P₁, P₂, F₁ e F₂ do cruzamento entre UENF 1381 e ECW.

Nota 1 = indivíduo sem sintomas, considerado resistente; Nota 2 = indivíduo com ligeiro sintoma demarcando a área inoculada, considerado resistente; Nota 3 = indivíduo com amarelecimento mais característico, delimitando a área inoculada, considerado suscetível; Nota 4 = indivíduo com amarelecimento forte e início de necrose, delimitando a área inoculada, considerado suscetível; Nota 5 = indivíduo com necrose bastante característica, delimitando fortemente a área inoculada, considerado suscetível.

No segundo experimento, testando-se resistência somente à raça P6, 40 plantas F₂ foram avaliadas, constatando-se que 29 destas foram resistentes e 11 foram suscetíveis (Tabela 1), o que ratifica a herança monogênica da resistência à mancha-bacteriana no cruzamento entre UENF 1381 e ECW.

Tabela 1 – Teste de χ^2 em geração F₂ do cruzamento entre UENF 1381 e ECW, em relação à resistência à mancha-bacteriana (raça P6), em Campos dos Goytacazes, em março de 2005 e maio de 2006

| População F ₂ | Março de 2005 | | | Maio de 2006 | | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|----------|--------------|------|----------|
| | (FO) ¹ | (FE) ² | χ^2 | (FO) | (FE) | χ^2 |
| Resistente | 62 | 63 | 0,0158 | 29 | 30 | 0,0333 |
| Suscetível | 22 | 21 | 0,0476 | 11 | 10 | 0,1000 |
| Total | 84 | 84 | 0,0634 | 40 | 40 | 0,1333 |

¹FO = Freqüência observada; ²FE = Freqüência esperada.

Inúmeras doenças em plantas são controladas pela resistência governada por um único gene dominante. É o caso dos genes *Bs1*, *Bs2* e *Bs3* em *Capsicum*, que conferem resistências às raças 0, 1, 2, 3, 4 e 5 (Kousik e Ritchie, 1996), mas não à raça P6, objeto de estudo deste trabalho. Outros exemplos podem ser mencionados, como o estudo da herança da resistência à *Stemphylium solani* e sua fitotoxina em algodoeiro resistente. As cultivares PR 94-82, PR 94-215 e CNPA Precoce 2, identificadas como resistentes, foram cruzadas com a cultivar suscetível IAPAR 71, inclusive com a realização de cruzamentos recíprocos. Após inoculação de duas folhas de cada planta com um isolado agressivo de *S. solani* e posterior avaliação, foi obtido o modelo de segregação simples incluindo um único gene na determinação do caráter, revelando uma proporção de 1:2:1, aceito pelo teste de qui-quadrado para os cruzamentos IAPAR 71 x PR94-82 e IAPAR 71 x CNPA-Precoce 2. Este teste indica que a resistência presente nas cultivares PR94-82 e CNPA-Precoce 2 é determinada individualmente por um gene dominante (Mehta e Árias, 2001).

Pegoraro et al. (2002), avaliando a mancha-foliar de feosféria em milho, com o objetivo de determinar o modo de herança do caráter, efetivaram o cruzamento entre sete linhagens de milho. Com base na freqüência dos indivíduos F₂, foi desenvolvida a hipótese de três genes maiores governando o caráter resistência à feosféria nos genótipos estudados, sendo, posteriormente, utilizado o teste de qui-quadrado para a verificação da adequação da hipótese de segregação. Os resultados indicaram que a seleção de genótipos resistentes à feosféria pode ser realizada com sucesso em programas de melhoramento do milho, visto que a manifestação do caráter é controlada por, pelo menos, dois genes independentes e com uma efetiva participação de efeitos aditivos.

Com o objetivo de determinar o controle genético da resistência à ferrugem-da-folha em aveia e identificar fontes de genes diferentes para resistência a esta doença, Cruz et al. (2001) realizaram estudos utilizando três genótipos resistentes (UFRGS 15, UFRGS 881920 e UFRGS 86A1194-2), três genótipos suscetíveis (UFRGS 7, UFRGS 8 e UFRGS 14) e a geração segregante F₃ proveniente dos cruzamentos entre os mesmos. As plantas foram avaliadas individualmente quanto à presença ou ausência da ferrugem-da-folha. Posteriormente, os dados destas leituras foram utilizados numa análise genética em que a hipótese de um ou dois genes de resistência foi testada pelo qui-quadrado. Os resultados indicaram a presença de um gene dominante de resistência no genótipo UFRGS 881920 e dois genes complementares no genótipo UFRGS 15 quando estes foram cruzados com os suscetíveis. A análise genética feita não permitiu determinar se esses dois genótipos são ou não a mesma fonte genética de resistência.

Linhas de tomateiro com hábito de crescimento determinado e resistência combinada a nematóides e tospovírus, obtidas do cruzamento entre a cultivar Nemadoro, resistente a nematóides de galhas, e a cultivar Stevens, resistente a tospovírus, foram avaliadas e, pelo teste de qui-quadrado, as linhas segregantes confirmaram a freqüência de três plantas resistentes para uma suscetível. Posteriormente, foram selecionadas Linhas F₅ com características agronômicas desejáveis e, então, inoculadas com mistura de *Meloidogyne* spp. e isolado de tospovírus, possibilitando a seleção de 27 linhagens com alta resistência a ambos patógenos, hábito de crescimento determinado e formato de fruto semelhante ao da Nemadoro (Carvalho et al., 1999).

Os híbridos comerciais de pimentão (*Capsicum annuum* L.) Acuario, Magali R, Nathalie e suas gerações F₂ e F₃, além dos híbridos Amanda, Corteso W208, CPC-6272, Dagmar, Elisa, Magali, Margarita, Monteiro, Quantum e Vivo W205, foram avaliados quanto à resistência do *Potato virus Y* (PVY), estirpe m (PVY^M). Nas avaliações, os híbridos Magali R e Nathalie apresentaram resistência controlada por um gene dominante, resultante do cruzamento de genitores resistentes versus suscetíveis. Por outro lado, os híbridos Amanda, Acuario, Corteso W208, Dagmar, Elisa, Margarita, Monteiro, Quantum e Vivo W205, considerados resistentes ao PVY, mostraram-se altamente suscetíveis à estirpe utilizada (Echer e Costa, 2002).

Nos dois experimentos, a nota média obtida para o genitor resistente (P₁)

foi de 1,2, enquanto para o genitor suscetível (P_2), a média variou nos dois anos de teste: 3,8 em 2005 e 3,9 em 2006, mostrando a suscetibilidade do genótipo. Já o híbrido F_1 teve média de 1,3 nos dois experimentos, e a média da população F_2 alcançou 2,1 em 2005 e 2,3 em 2006.

Com base nos dados obtidos para as gerações P_1 , P_2 , F_1 e F_2 , foi possível determinar o Grau Médio de Dominância (GMD) para os experimentos realizados nas duas épocas. Valores atribuídos ao Grau Médio de Dominância (GMD) permitem conhecer o tipo de interação alélica presente para o caráter em estudo. Assim, quando $GMD = 0$, não há dominância; se $GMD = 1$, há dominância completa; se GMD estiver compreendido entre 0 e 1, ocorre dominância parcial, e se o $GMD > 1$, há sobredominância (Ramalho et al., 1993). Nas duas ocasiões, ou seja, tanto nos experimentos de 2005 e 2006, obtiveram-se valores de grau médio de dominância (GMD) correspondentes a 0,92 e 0,93 respectivamente, indicando a ocorrência de dominância parcial para o caráter em questão. Neste caso, a ação gênica dos heterozigotos mostra fenótipo mais próximo ao genitor homocigoto resistente, conforme pode ser observado nas Figuras 11 e 12, em frequências de notas observadas na geração F_2 . Este resultado revela que grande parte dos indivíduos apresentou notas 1 e 2, caracterizando resistência à mancha-bacteriana.

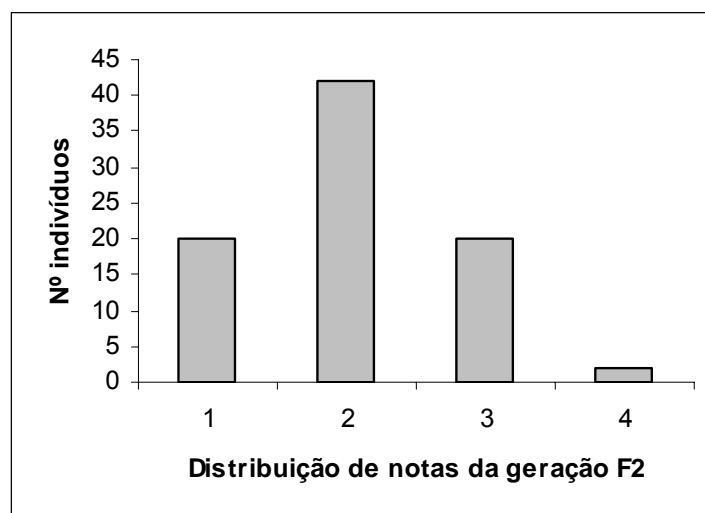


Figura 11 – Distribuição de notas para reação à mancha-bacteriana (raça 6) entre a população segregante F_2 , obtida do cruzamento entre UENF 1381 e ECW em março de 2005.

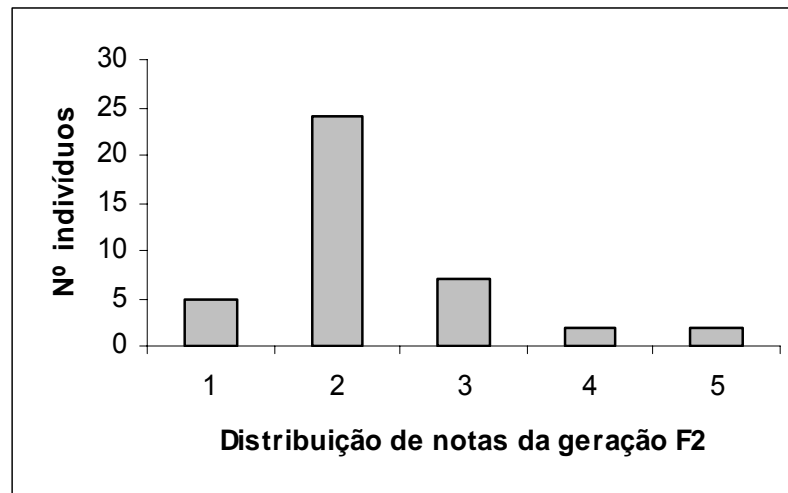


Figura 12 – Distribuição de notas para reação à mancha-bacteriana (raça 6) entre a população segregante F₂, obtida do cruzamento entre UENF 1381 e ECW em maio de 2006.

O resultado obtido no presente trabalho reveste-se de importância, pois, até o momento, resistência monogênica dominante a essa raça do patógeno só havia sido descrita por Sahin e Miller (1998) em um acesso de *Capsicum pubescens*, que não tem possibilidade de ser transferida para plantas de *C. annuum* com as técnicas hoje disponíveis, porque as espécies pertencem a complexos gênicos distintos, não sendo intercruzáveis (Vernet, 2006).

O genitor UENF 1381, apesar de ser uma pimenta e ter pungência, é da espécie *C. annuum*, que pode ser cruzada com cultivares de pimentão para futura obtenção de linhagens sem pungência e resistentes à mancha-bacteriana, embora deva ser ressaltada a dificuldade em se conseguir um grande número de sementes F₂ e o RC₂ neste trabalho. Outro aspecto importante é que também foi constatada resistência à raça P3 presente nesse acesso (Costa, 2000; Sudré, 2003), controlada por três genes recessivos, a qual já vem sendo utilizada em programas de melhoramento de pimentão para resistência à mancha-bacteriana (Riva, 2002; Riva et al., 2004; Riva, 2006).

É bastante provável que as linhas de melhoramento desenvolvidas a partir de UENF 1381 para resistência à raça 3, por Riva (2006), também tenham resistência a P6, fato este que sugere a realização de avaliações para ambas as raças em futuras etapas do programa de melhoramento conduzido na UENF.

Apesar de ser controlada por um gene dominante e do uso de híbridos ser economicamente importante para a cultura do pimentão, essa alternativa não é

viável neste caso, visto que UENF 1381 possui pungência em seus frutos. Essa característica, cuja presença é governada por um gene dominante C (Harvell e Bosland, 1997), é indesejável quando se pensa em comercializar pimentão, o qual é naturalmente considerado e definido como “doce”, ou seja, não-pungente. Entretanto, é possível considerar a hipótese de se obterem linhas recombinadas que tenham o gene de resistência e sejam doces e que possam tanto ser recomendadas como cultivares ou em cruzamentos para obtenção de híbridos resistentes.

Por outro lado, poder-se-ia pensar em explorar esse gene de resistência em híbridos de pimenta, sugerindo que estudos sobre a capacidade combinatória sejam conduzidos para determinar as combinações híbridas de interesse para os produtores, ou seja, que associem a resistência à produção e qualidade de frutos.

4.1.2. Análise com base nas linhas F₃

Verificou-se diferença altamente significativa entre as 28 linhas F₃ selecionadas, tanto para reação à mancha-bacteriana avaliada por nota quanto para a AACPD, indicando que houve variabilidade entre os tratamentos avaliados em relação à resistência à raça P6 (Tabela 2). As linhas F₃ selecionadas para a avaliação foram aquelas que deram resultado positivo, ou seja, foram resistentes somente para a raça 6. A expectativa era identificar possíveis heterozigotos entre as plantas F₂ pela observação da segregação da resistência na geração F₃.

O coeficiente de variação (CV) foi estimado em 49,85% para reação à mancha-bacteriana por escala de notas e, para AACPD, em 35,18%, valores considerados muito altos. Esse coeficiente está diretamente relacionado com a precisão experimental nos ensaios agrícolas de campo, estabelecendo classificação baixa (quando inferior a 10%), média (10 a 20%), alta (20 a 30%) e muito alta (superior a 30%) (Pimentel-Gomes, 2000). Entretanto, valores acima de 50% podem ocorrer em avaliação para algumas características (Gomes e Garcia, 2002).

Valores de CV muito altos podem ser considerados comuns em avaliação de resistência a doenças. Santos et al. (2004) observaram CV de 37,9% para AACPD em mandioca, e Gonçalves et al. (2004), avaliando mildio em cebola, registraram CV de 43,9%. Avaliando seis gerações de *Capsicum*, obtidas a partir do cruzamento de ‘Apolo’ e BGH 1772 em reação à mancha-bacteriana em folhas, Juhász (2002) verificou CV de 34,04%, indicando alta influência ambiental.

Riva (2006), avaliando *Capsicum* para reação à mancha-bacteriana, em porcentagem de área foliar com sintomas, obteve CV geral de 30,17% e 31,10% para linhas F_{2:3}.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para reação à mancha-bacteriana determinada por escala de notas em folhas das 28 linhas F₃ obtidas do cruzamento entre UENF 1381 x ECW

| F.V. | GL | (QM) ^{1/} | |
|------------|-----|--------------------|-----------|
| | | Notas | AACPD |
| Tratamento | 27 | 1,1411** | 34,1439** |
| Resíduo | 252 | 0,3773 | 10,5777 |
| CV (%) | | 49,85 | 35,18 |

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

^{1/} Notas = notas para reação à mancha-bacteriana, AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença.

4.1.3. Teste de médias

Foi possível observar, para avaliação de resistência à mancha-bacteriana via escala de notas, a formação de dois grupos distintos entre as 28 linhas F₃ avaliadas (Tabela 3). O primeiro grupo foi composto de seis linhas cujas notas variaram entre 1,5 e 2,1. Apesar de estarem classificados em um grupo separado das linhas consideradas resistentes (segundo grupo), alguns indivíduos destas linhas também apresentaram resultados promissores e possuem algum nível de resistência quando comparados ao genitor suscetível, que recebeu nota 4,0.

O segundo grupo foi caracterizado pelo maior número de tratamentos e menor estimativa de notas para a doença, indicando indivíduos altamente resistentes à mesma. Neste grupo, estão inclusas 22 linhas F₃, com notas variando de 1,0 a 1,4.

Apesar de não constarem na avaliação do teste de médias, os genitores ECW, descrito como suscetível à mancha-bacteriana, e UENF 1381, resistente, apresentaram valores médios de 4,0 e 1,2, respectivamente. O primeiro genitor confirmou a sua condição de suscetibilidade à mancha-bacteriana pelo registro de um dos maiores valores obtidos na escala de notas (4,0); já o resultado obtido para o genitor UENF 1381 caracteriza a resposta de resistência.

Tabela 3 – Teste de médias para reação à mancha-bacteriana via escala de notas em 28 Linhas F₃, agrupadas pelo teste Scott Knott (1974)

| Genótipos | Médias ^{1/} | Genótipos | Médias ^{1/} |
|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| F ₃ – 2 | 2,1 a | F ₃ – 27 | 1,0 b |
| F ₃ – 22 | 2,0 a | F ₃ – 26 | 1,0 b |
| F ₃ – 1 | 1,9 a | F ₃ – 25 | 1,0 b |
| F ₃ – 14 | 1,7 a | F ₃ – 24 | 1,0 b |
| F ₃ – 12 | 1,6 a | F ₃ – 20 | 1,0 b |
| F ₃ – 5 | 1,5 a | F ₃ – 19 | 1,0 b |
| F ₃ – 7 | 1,4 b | F ₃ – 18 | 1,0 b |
| F ₃ – 15 | 1,3 b | F ₃ – 17 | 1,0 b |
| F ₃ – 3 | 1,3 b | F ₃ – 16 | 1,0 b |
| F ₃ – 23 | 1,2 b | F ₃ – 11 | 1,0 b |
| F ₃ – 21 | 1,2 b | F ₃ – 10 | 1,0 b |
| F ₃ – 13 | 1,2 b | F ₃ – 9 | 1,0 b |
| F ₃ – 4 | 1,1 b | F ₃ – 8 | 1,0 b |
| F ₃ – 28 | 1,0 b | F ₃ – 6 | 1,0 b |

^{1/}Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias proposto por Skott-Knott (1974), em nível de 1% de probabilidade. Médias dos genitores: ECW = 4,0 e UENF 1381 = 1,2.

A avaliação de teste de médias considerando o estudo de AACPD para reação à mancha-bacteriana também proporcionou a formação de dois grupos distintos (Tabela 4), revelando pequena variação em relação àquele obtido por meio da avaliação de resistência via escala de notas.

Este método se aplica ao cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença, por meio de avaliações periódicas da severidade da doença com o uso de escalas próprias, podendo ser usado como descritor de uma epidemia quando o objetivo é resumir uma curva de progresso de doença em dados que possam ser analisados e comparados (Campbell e Madden, 1990). Deste modo, é possível uma avaliação mais estável, sendo menos afetada pelo tempo de análise e flutuações ambientais (Souza e Duarte, 2002).

Tabela 4 – Teste de médias para reação à mancha-bacteriana pelo cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em 28 Linhas F₃ agrupadas pelo teste Scott-Knott (1974)

| Genótipos | Médias ^{1/} | Genótipos | Médias ^{1/} |
|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| F ₃ – 22 | 13,9 a | F ₃ – 27 | 8,0 b |
| F ₃ – 1 | 13,5 a | F ₃ – 26 | 8,0 b |
| F ₃ – 2 | 13,1 a | F ₃ – 25 | 8,0 b |
| F ₃ – 14 | 11,9 a | F ₃ – 24 | 8,0 b |
| F ₃ – 12 | 10,8 a | F ₃ – 20 | 8,0 b |
| F ₃ – 5 | 10,7 a | F ₃ – 19 | 8,0 b |
| F ₃ – 7 | 10,4 a | F ₃ – 18 | 8,0 b |
| F ₃ – 15 | 9,5 b | F ₃ – 17 | 8,0 b |
| F ₃ – 3 | 9,3 b | F ₃ – 16 | 8,0 b |
| F ₃ – 23 | 9,2 b | F ₃ – 11 | 8,0 b |
| F ₃ – 21 | 9,2 b | F ₃ – 10 | 8,0 b |
| F ₃ – 13 | 9,2 b | F ₃ – 9 | 8,0 b |
| F ₃ – 4 | 8,1 b | F ₃ – 8 | 8,0 b |
| F ₃ – 28 | 8,0 b | F ₃ – 6 | 8,0 b |

^{1/}Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias proposto por Skott e Knott (1974), em nível de 1% de probabilidade. Médias dos genitores: ECW = 27,0 e UENF 1381 = 9,8.

Devido à possibilidade de observações claras e precisas das diferenças nas taxas de crescimento das infecções, a determinação da área abaixo da curva do progresso da doença é uma maneira clássica e precisa para diferenciar genótipos com diferentes níveis de resistência (Souza, 2006).

Esse fato fica evidenciado na formação do primeiro grupo, caracterizado pela presença de sete tratamentos, ou seja, um a mais do que o teste de médias por escala de notas, diferenciando-se também a ordem das três primeiras posições; as demais foram correspondentes. Os valores deste primeiro grupo variaram de 10,4 a 13,9. O segundo e maior grupo registrou a presença de 21 tratamentos, com os menores valores, os quais variaram de 8,0 a 9,5, indicando os maiores níveis de resistência na avaliação (Tabela 4).

Também foi caracterizada, apesar de não presente na tabela, por avaliação mediante cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença, a discriminação entre os genitores ECW e UENF 1381, os quais apresentaram

valores de 27,0 e 9,8 respectivamente, destacando mais uma vez a suscetibilidade do genitor ECW.

Nos dois testes de médias envolvendo as avaliações por escala de notas e AACPD, possivelmente os indivíduos caracterizados no primeiro grupo correspondem a heterozigotos F_2 selecionados previamente para resistência à mancha-bacteriana no primeiro experimento, pois apresentaram segregação nas linhas F_3 , registrando variação nos valores de notas. No campo, foi possível observar que as linhas F_3 que não segregaram para resistência foram: 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 25, 26, 27 e 28. Já as linhas F_3 que segregaram para resistência foram: 1, 2, 5, 7, 12, 13, 14, 15, 21, 22 e 23.

Desse modo, foi possível observar que os tratamentos presentes no primeiro grupo fazem parte dos indivíduos segregantes para o caráter em questão, e sua distribuição faz-se por maior intensidade da nota ou maior frequência com que a nota foi registrada, dependendo da avaliação ser realizada por escala de notas ou cálculo da AACPD (Tabelas 3 e 4).

Trabalhos com escalas de notas são observados por vários pesquisadores. Souza e Duarte (2002), por exemplo, estimaram a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em relação à avaliação da severidade da doença causada por *Phaeosphaeria maydis* em populações primitivas, melhoradas e híbridos comerciais de milho, utilizando uma escala de notas variando de 1 (altamente resistente) a 9 (altamente suscetível). Considerando-se os valores de AACPD, foi possível identificar os genótipos mais resistentes à *Phaeosphaeria maydis*, identificados como Azteca, C 435, AG 1051 e C 333B, ao passo que o mais suscetível foi o AG 9012.

A pequena diferença observada nos dois tipos de avaliação, escala de notas e AACPD, pode ser explicada a partir da maior precisão e confiabilidade que a análise de AACPD permite ao considerar os dias de avaliação. A AACPD tem merecido uma maior atenção devido à maior consistência dos dados, por computar as variações observadas na severidade da doença em decorrência do seu período de progressão, ou seja, o método leva em conta o período de tempo em que são realizadas as avaliações e como foi o comportamento do progresso da doença neste período (Riva, 2006).

Situação diferente ocorre para a avaliação por meio de escala de notas, na qual o resultado principal é o registro do último dia de avaliação, ou seja, neste estudo foram realizadas cinco avaliações num período de 15 dias, mas somente a

última nota registrada foi considerada na avaliação. Para AACPD são considerados todos os dados, do primeiro ao último dia de avaliação.

4.2. Características avaliadas nos frutos

Houve diferença altamente significativa para todas as características agronômicas avaliadas nas 28 linhas F_3 (Tabela 5), o que indica existência de diferenças genéticas entre os tratamentos estudados no presente trabalho. Os valores dos coeficientes de variação, para as características avaliadas, foram 29,29% para o Peso Médio dos Frutos; 18,15% para o Comprimento Médio dos Frutos e 14,60% para o Diâmetro Médio dos Frutos.

Sudré (2003), avaliando acessos de *Capsicum*, também relatou valores altos de coeficiente de variação para a variável peso médio de frutos (23,52%). Juhász (2002), em pimentão, encontrou valores de CV para comprimento e diâmetro de frutos semelhantes aos obtidos neste trabalho, sendo, respectivamente, 17,81 e 14,77%. Entretanto, para o peso médio de frutos, o CV foi inferior ao relatado neste experimento, sendo igual a 16,47%.

Avaliando cultivares de tomateiro em ambiente protegido, Fiori (2006) obteve valores de CV de 10,79% para número de frutos e 16,59% para peso de frutos. Para as características comprimento, diâmetro e peso médio de frutos, Riva (2006) registrou valores de CV iguais a 10,97, 15,02 e 22,40%. Percebe-se que as variáveis relacionadas à produção destacam-se como as mais influenciadas pelo ambiente, obtendo maiores valores de coeficiente de variação em relação às outras características. Este dado se deve ao fato de que características quantitativas são mais sujeitas às interferências geradas pelo ambiente.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância das variáveis peso, comprimento e diâmetro médio de frutos, referentes a 28 tratamentos (28 Linhas F3 resistentes à mancha-bacteriana)

| F.V. | GL | (QM) ^{1/} | | |
|------------|-----|--------------------|-----------|----------|
| | | PMF | CMF | DMF |
| Tratamento | 27 | 449,97** | 1704,23** | 282,39** |
| Resíduo | 252 | 37,12 | 147,68 | 20,91 |
| CV (%) | | 29,29 | 18,15 | 14,60 |

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

^{1/} PMF = peso médio de frutos; CMF = comprimento médio de frutos e DMF = diâmetro médio de frutos.

4.2.1. Teste de médias para características agronômicas

Pelo teste de médias para peso médio de frutos (PMF), foi possível registrar a formação de quatro grupos distintos entre as 28 linhas F₃ (Tabela 6).

As linhas F₃-19, F₃-25 e F₃-17 representaram o primeiro grupo, destacando-se como os tratamentos com maiores PMF, com valores correspondentes a 37,72, 33,24 e 32,81g. Apesar da ausência dos genitores na análise de teste de médias para PMF, foi possível registrar a ocorrência de segregação transgressiva, ou seja, as linhas F₃ presentes no primeiro grupo superaram o valor do genitor ECW, o qual possui peso médio de fruto em torno de 29,50 g.

O grupo seguinte, caracterizado por seis linhas F₃, obteve valores que variaram de 29,45 a 23,25g. O terceiro grupo reuniu o maior número de tratamentos, o qual agrupou um total de 12 linhas F₃, caracterizando menor variabilidade em indivíduos deste grupo, com variação de valores de 21,86 a 16,82g. Sete linhas F₃ formaram o grupo quatro, correspondendo ao segundo maior grupo, e seus valores de PMF variaram de 15,06 a 11,70g. Esses valores estão abaixo do que é normalmente considerado como tamanho comercial para classificação segundo os padrões de mercado, que chega a cerca de 112 g para o peso do fruto, conforme registrado por Marcussi et al. (2004), em avaliação de produção de frutos de pimentão em plantas da cv. Elisa. Isso se deve ao fato de que o cruzamento foi efetuado entre genótipos contrastantes para o tamanho de fruto: ECW é um fruto com padrão mais comercial, do tipo quadrado, enquanto UENF 1381 é uma pimenta com frutos considerados pequenos para os padrões

normais de comercialização de pimentão. Entretanto, novas tendências de mercado têm apontado para a produção de hortaliças diferenciadas em termos de tamanho, como é o caso das mini-cenouras, mini-berinjelas, entre outros. Dessa forma, vislumbra-se a possibilidade de também serem introduzidos no mercado frutos de pimentão com menor tamanho.

Tabela 6 – Médias para peso médio de frutos (PMF) em 28 tratamentos (linhas F₃) agrupados pelo teste Scott-Knott (1974)

| Genótipos | ^{1/} Médias | Genótipos | ^{1/} Médias |
|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| F ₃ – 19 | 37,72 a | F ₃ – 22 | 18,37 c |
| F ₃ – 25 | 33,24 a | F ₃ – 28 | 18,32 c |
| F ₃ – 17 | 32,81 a | F ₃ – 18 | 17,94 c |
| F ₃ – 11 | 29,45 b | F ₃ – 12 | 17,82 c |
| F ₃ – 2 | 28,43 b | F ₃ – 27 | 17,30 c |
| F ₃ – 21 | 25,54 b | F ₃ – 1 | 16,97 c |
| F ₃ – 24 | 25,10 b | F ₃ – 23 | 16,82 c |
| F ₃ – 26 | 24,46 b | F ₃ – 5 | 15,06 d |
| F ₃ – 8 | 23,25 b | F ₃ – 3 | 14,47 d |
| F ₃ – 20 | 21,86 c | F ₃ – 15 | 14,41 d |
| F ₃ – 6 | 21,09 c | F ₃ – 7 | 14,25 d |
| F ₃ – 14 | 21,07 c | F ₃ – 10 | 13,64 d |
| F ₃ – 4 | 19,96 c | F ₃ – 13 | 12,62 d |
| F ₃ – 9 | 18,64 c | F ₃ – 16 | 11,70 d |

^{1/}Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias proposto por Skott e Knott (1974), em nível de 1% de probabilidade. Média dos genitores: ECW = 29,50 g e UENF 1381 = 2,37 g.

A avaliação das 28 linhas F₃, para comprimento médio de frutos (CMF), registrou a formação de três grupos distintos, indicando a variabilidade presente nos tratamentos para esta característica (Tabela 7).

Tabela 7 – Médias para comprimento médio de frutos (CMF), em milímetros, em 28 tratamentos (linhas F₃) agrupados pelo teste Scott-Knott (1974)

| Genótipos | ^{1/} Médias | Genótipos | ^{1/} Médias |
|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| F ₃ – 21 | 99,24 a | F ₃ – 11 | 61,88 c |
| F ₃ – 4 | 96,71 a | F ₃ – 1 | 61,19 c |
| F ₃ – 2 | 87,24 b | F ₃ – 5 | 61,13 c |
| F ₃ – 27 | 83,69 b | F ₃ – 15 | 60,39 c |
| F ₃ – 19 | 81,05 b | F ₃ – 26 | 60,19 c |
| F ₃ – 28 | 78,45 b | F ₃ – 12 | 59,50 c |
| F ₃ – 25 | 74,74 b | F ₃ – 17 | 59,14 c |
| F ₃ – 10 | 71,55 c | F ₃ – 7 | 58,53 c |
| F ₃ – 22 | 69,32 c | F ₃ – 16 | 57,07 c |
| F ₃ – 20 | 66,66 c | F ₃ – 18 | 54,88 c |
| F ₃ – 27 | 66,38 c | F ₃ – 3 | 54,40 c |
| F ₃ – 24 | 66,28 c | F ₃ – 8 | 54,01 c |
| F ₃ – 6 | 65,46 c | F ₃ – 14 | 53,52 c |
| F ₃ – 9 | 64,95 c | F ₃ – 13 | 46,32 c |

^{1/}Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias proposto por Skott-Knott (1974), em nível de 1% de probabilidade. Média dos genitores: ECW = 82,03mm e UENF 1381 = 33,17 mm.

O primeiro grupo foi representado por apenas duas linhas F₃, observando-se maiores valores de CMF para as linhas F₃-21 e F₃-4 com valores correspondentes a 99,24 e 96,71mm, respectivamente. Cinco linhas F₃ configuraram o segundo grupo, com valores variando entre 74,74 e 87,24 mm. O terceiro e último grupo apresentou o maior número de tratamentos, agrupando 21 indivíduos, cujos valores variaram de 46,32 a 71,51 mm.

O valor obtido para a média do genitor ECW (82,03 mm) permitiu registrar novamente a observação de indivíduos transgressivos para o caráter, ou seja, plantas que obtiveram comprimento médio de frutos acima do valor verificado para o pai superior, para esta característica (ECW). Este resultado foi observado para as duas linhas presentes no primeiro grupo, linha F₃-21 (99,24 mm) e F₃-4 (96,71 mm), e duas linhas presentes no segundo grupo, F₃-2 (87,24 mm) e F₃-27 (83,69 mm). Para o comprimento médio dos frutos, os valores observados para as linhas testadas estão próximos daqueles observados para frutos

classificados como comerciais (Marcussi et al., 2004).

Em relação à característica diâmetro médio de frutos (DMF), foi verificada a formação de três grupos, indicando variabilidade para a característica (Tabela 8).

O primeiro grupo envolveu quatro linhas F₃, quais sejam, as linhas F₃-17 (43,14 mm), F₃-24 (41,44 mm), F₃-19 (39,51 mm) e F₃-11 (39,35 mm). Sete tratamentos foram reunidos no segundo grupo, com valores variando entre 37,40 e 33,03 mm. O terceiro grupo, o maior de todos, reuniu um total de 17 linhas F₃, as quais apresentaram valores que variaram de 29,99 a 22,14 mm.

Tabela 8 – Médias para diâmetro médio de frutos (DMF) em 28 tratamentos (linhas F₃) agrupados pelo teste Scott-Knott (1974)

| Genótipos | ^{1/} Médias | Genótipos | ^{1/} Médias |
|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| F ₃ – 17 | 43,14 b | F ₃ – 12 | 29,08 e |
| F ₃ – 24 | 41,44 b | F ₃ – 22 | 29,04 e |
| F ₃ – 19 | 39,51 c | F ₃ – 28 | 28,97 e |
| F ₃ – 11 | 39,35 c | F ₃ – 9 | 28,35 e |
| F ₃ – 25 | 37,40 c | F ₃ – 18 | 28,13 e |
| F ₃ – 8 | 35,90 c | F ₃ – 15 | 27,74 e |
| F ₃ – 26 | 34,35 d | F ₃ – 13 | 27,46 e |
| F ₃ – 14 | 34,26 d | F ₃ – 23 | 26,99 e |
| F ₃ – 20 | 34,00 d | F ₃ – 27 | 26,76 e |
| F ₃ – 6 | 33,49 d | F ₃ – 10 | 26,06 e |
| F ₃ – 2 | 33,03 d | F ₃ – 16 | 25,95 e |
| F ₃ – 21 | 29,99 e | F ₃ – 4 | 24,44 f |
| F ₃ – 1 | 29,96 e | F ₃ – 7 | 22,14 f |
| F ₃ – 5 | 29,83 e | UENF 1381 | 14,36 g |

^{1/}Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias proposto por Skott-Knott (1974), em nível de 1% de probabilidade. Médias dos genitores: ECW = 61,78 mm e UENF 1381 = 14,36 mm.

Não houve registro de segregação transgressiva, já que os genitores tiveram CMF de 61,78 mm (ECW) e 14,36 mm (UENF1381). Para o CMF, observou-se o mesmo resultado verificado para peso médio de frutos: os valores de CMF ficaram abaixo do que se encontra hoje no mercado de pimentões

comerciais, que é em torno de 7,0 cm (Marcussi et al., 2004).

A variabilidade existente entre os genitores UENF 1381 e ECW e os mais variados tipos de frutos produzidos por algumas das linhas F₃ pode ser observada na Figura 13.

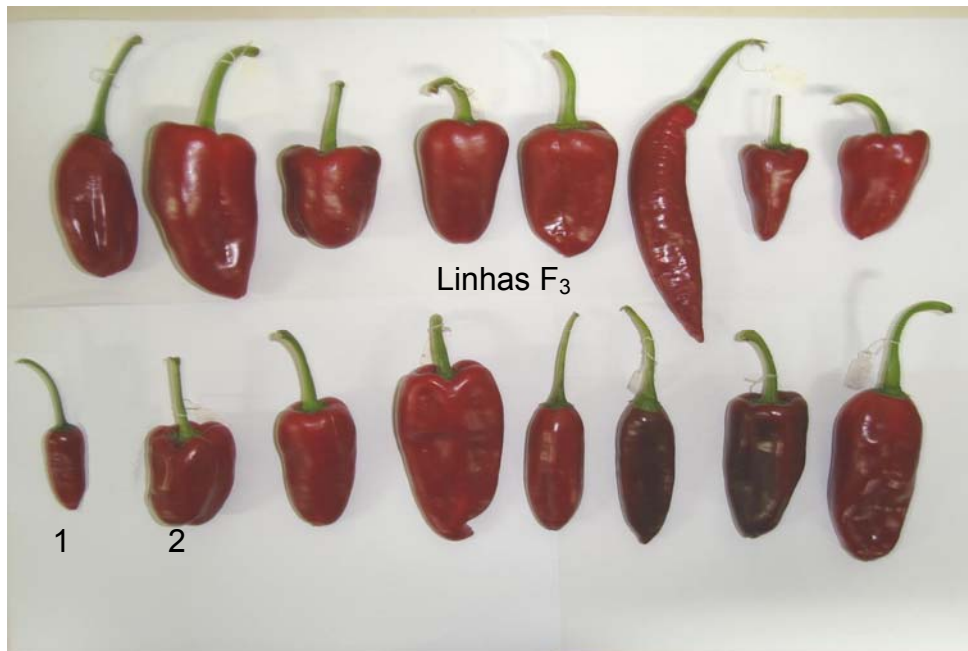


Figura 13 – Variabilidade entre frutos de *Capsicum annuum* L. produzidos por algumas linhas F₃ e os genitores UENF 1831 (1) e ECW (2).

4.3. Herança da pungência

No primeiro experimento, 84 plantas da geração F₂ foram testadas para presença ou ausência de capsaicina nos frutos, juntamente com os pais e F₁. Como esperado, detectou-se pungência (presença de capsaicina) nos frutos de UENF 1381 (pimenta), mas não em frutos de ECW (pimentão). Os frutos do híbrido F₁ também apresentaram pungência, demonstrando que a dominância está envolvida no controle da presença de capsaicina.

A análise em 84 plantas da geração F₂ corroborou essa expectativa, pois em 62 destas foi detectada a presença de capsaicina e 22 não registraram a ocorrência desse alcalóide (Figura 14). O teste do qui-quadrado mostrou que essa proporção se adequa à hipótese de que um gene dominante controla a presença de capsaicina (Tabela 9).

Os dados do segundo experimento foram concordantes com os dados anteriores, ratificando a herança dominante do caráter para este estudo. A análise

nas 40 plantas da geração F₂ indicou a presença de pungência em 32 destas e somente oito não registraram o alcalóide (Figura 15). Os dados foram analisados no teste de qui-quadrado, demonstrando a adequação da proporção observada na hipótese sugerida para o controle da presença de capsaicina (Tabela 9).

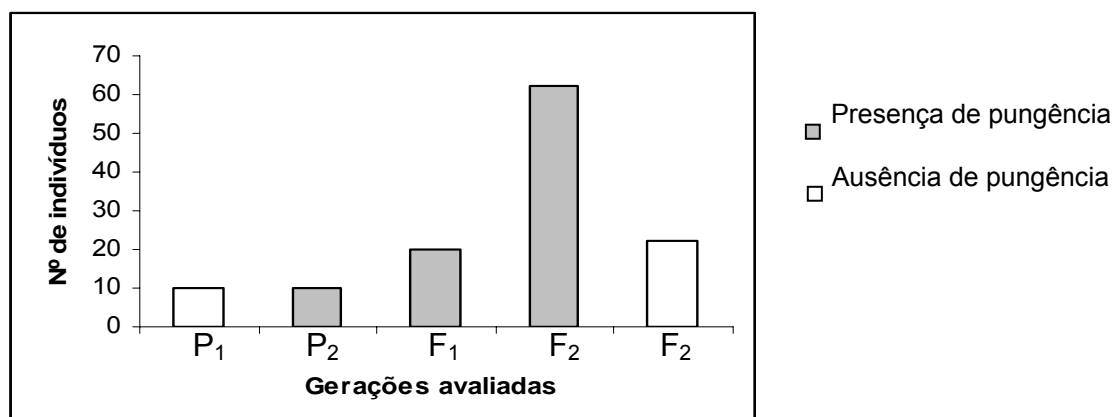


Figura 14 – Avaliação de presença/ausência de pungência entre os genitores UENF 1381 (P₁), ECW (P₂), indivíduos F₁ e população segregante F₂, em março de 2005.

Tabela 9 – Teste de χ^2 em geração F₂ avaliando a freqüência de presença ou ausência de pungência em frutos de *Capsicum annuum* L. Campos dos Goytacazes, em março de 2005 e maio de 2006

| | Março de 2005 | | | Maio de 2006 | | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|----------|--------------|------|----------|
| | (FO) ¹ | (FE) ² | χ^2 | (FO) | (FE) | χ^2 |
| População F ₂ | | | | | | |
| Pungente | 62 | 63 | 0,0158 | 32 | 30 | 0,1333 |
| Não-pungente | 22 | 21 | 0,0476 | 8 | 10 | 0,4000 |
| Total | 84 | 84 | 0,0634 | 40 | 40 | 0,5333 |

¹FO = Freqüência observada; ²FE = Freqüência esperada.

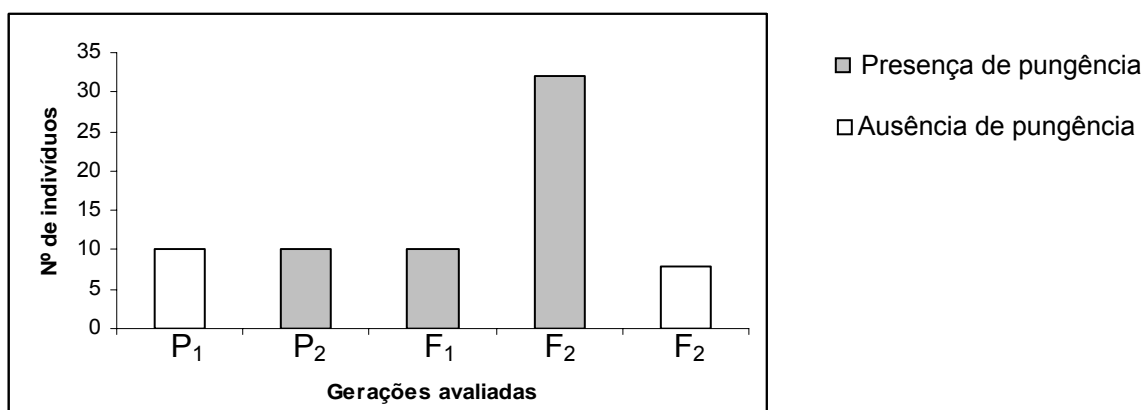


Figura 15 – Avaliação de presença/ausência de pungência entre os genitores UENF 1381 (P₁), ECW (P₂), indivíduos F₁ e população segregante F₂, em maio de 2006.

Esse resultado está de acordo com a maioria dos relatos encontrados na literatura, que atribuem a presença de capsaicina à expressão do gene dominante C (Harvell e Bosland, 1997; Blum et al., 2002). Plantas com o genótipo CC ou Cc possuem capsaicina na placenta de seus frutos, entretanto, o teor desse alcalóide pode variar em função da presença de genes de efeito menor que determinam o grau de pungência, ou seja, a quantidade de capsaicina presente nos frutos (Aluru et al., 2003). Portanto, a presença ou ausência de capsaicina é considerada pelos autores um caráter qualitativo, enquanto o teor de capsaicina é quantitativo, sendo bastante influenciado pelo ambiente.

Existem ainda relatos na literatura de que o controle genético desse caráter seja feito por dois locos epistáticos (duplo dominantes) e por ação de genes modificadores (Wagner, 2003).

Diversos métodos para determinação da presença e do teor de capsaicinóides estão disponíveis, desde os mais simples, como o “teste de Scoville”, até métodos espectrofotométricos (Barbero et al., 2006) e cromatográficos, como HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) (Lee et al., 2005).

O “teste de Scoville” é baseado na degustação, por um provador, de uma amostra de pimenta moída em uma solução de água com açúcar, provocando uma sensação ardente inevitavelmente. Posteriormente, esta solução é diluída gradualmente com água até que o degustador já não possa notar a sensação ardente. Quanto mais diluída é a solução, maior a ardência original. Esse teste é o mais barato entre as técnicas de laboratório, porém tem limitações devido à

medição ser subjetiva e depender do paladar e da sensibilidade do provador (Bosland, 1996).

O método espectrofotométrico utiliza técnica óptica nas investigações biológicas e físico-químicas de elementos. O instrumento usado é o espectrofotômetro, o qual permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto e uma quantidade conhecida da mesma substância (Barbero et al., 2006).

Por sua vez, a cromatografia é considerada uma das técnicas mais precisas na quantificação da pungência (Wierzbicki, 2003). Entretanto, os métodos cromatográficos também apresentam algumas desvantagens. A cromatografia líquida, por exemplo, promove rápida degeneração da coluna cromatográfica, o que diminui a resolução e aumenta o custo final das análises (Passini, 2002).

Num programa de melhoramento de *Capsicum*, sobretudo quando se utilizam genótipos com e sem capsaicinóides, como é o caso do presente trabalho, é imprescindível que a identificação de plantas pungentes seja feita para separar os pimentões das pimentas. Considerando ainda que, num programa de melhoramento, são avaliadas centenas e, às vezes, milhares de plantas, o método de avaliação da pungência deve ser, além de eficaz, rápido, barato e de fácil execução.

O método proposto por Derera (2000) atende a esses requisitos, sendo, por isso, utilizado no presente trabalho. Uma comparação entre indivíduo pungente e não-pungente pode ser observada na Figura 16. Segundo Reda (2004), a capsaicina é um antioxidante muito eficaz no combate aos processos oxidativos a altas temperaturas, protegendo o ácido oléico durante processo de aquecimento. Deste modo, pode-se concluir que, em contato com o reagente, ocorre oxidação intensa da placenta com a presença dos capsaicinóides, tornando-a escurecida (marrom), ao contrário do que ocorre com os frutos cujas placentas não têm capsaicinóides, que não reagem, apresentando uma coloração esbranquiçada.



Figura 16 – Determinação de presença ou ausência de capsaicinóides em placentas de frutos de *Capsicum annuum* derivados do cruzamento UENF 1381 (pungente) x ECW (não pungente), utilizando-se o “teste de Derera” (2000).

Plantas das linhas F_3 previamente selecionadas como resistentes à mancha-bacteriana foram também submetidas à avaliação da presença ou ausência de capsaicinóides. Pôde-se observar variação entre e dentro das linhas para esse caráter, indicando que algumas plantas F_2 selecionadas eram heterozigotas. Foi possível também identificar nove linhas F_3 que se caracterizaram pela ausência de capsaicinóides (linhas 2, 4, 5, 11, 19, 22, 26, 27 e 28). Estas linhas, resistentes e sem pungência, têm potencial para, prosseguindo-se o programa de melhoramento com novas etapas de seleção e avaliação, darem origem a novas cultivares de pimentão, ressaltando-se as linhas 2, 11, 19 e 26, as quais se destacaram dentre as demais para as características agronômicas avaliadas.

Em onze linhas F_3 (6, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 21 e 25), entre as selecionadas para resistência, observou-se a presença de capsaicinóides em 100% das plantas testadas, indicando que, provavelmente, os indivíduos F_2 selecionados eram homozigotos para o alelo C. Essas Linhas têm potencial de uso como pimentas. Segregação para o caráter presença de capsaicinóides foi observada em oito linhas F_3 (1, 3, 9, 14, 17, 20, 23 e 24).

4.4. Parâmetros genéticos

4.4.1. Reação à mancha-bacteriana com base na população F₂

Por meio da Tabela 10, é possível observar as estimativas dos parâmetros genéticos obtidos para resistência à mancha-bacteriana com base na população F₂, nos experimentos realizados em março de 2005 e maio de 2006.

Elevadas magnitudes da herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) com respectivos valores de 68,13 e 73,54%, no primeiro e segundo experimentos, foram observadas para resistência à mancha-bacteriana. Esses resultados sugerem uma pequena interferência das variações ambientais na expressão da resistência, revelando expectativa de possíveis ganhos em seleção de genótipos para a característica estudada. Estes dados são reforçados devido à pequena contribuição de variação ambiental (σ_e^2) 0,22 e 0,23 em relação à variação fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$) 0,69 e 0,88.

Conforme já discutido anteriormente, no item 4.1.1., o grau médio de dominância (gmd) observado apresenta valores de 0,92 e 0,93 para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente, concordando com a informação de que o tipo de interação alélica presente para o caráter em estudo indica a ocorrência de dominância parcial. Deste modo, os heterozigotos apresentam fenótipo mais próximo ao genitor homozigoto resistente, conforme observado no resultado de avaliação para mancha-bacteriana no campo, sendo que grande parte da população F₂ apresentou resistência, semelhante ao genitor UENF 1381.

Outro dado importante observado no estudo é o número de genes envolvidos no controle do caráter, cujos dados indicam a presença de 1,78 e 1,40 genes presentes no controle da resistência à mancha-bacteriana no primeiro e segundo experimentos, respectivamente (Tabela 10). Houve pouca influência ambiental na resistência, estando de acordo com o resultado de análise da herança descrita no item 4.1.1., que descreve a resistência como um caráter qualitativo, controlado por um gene dominante.

Possíveis estimativas do número de genes envolvidos no controle de um dado caráter são fundamentais na tomada de decisões em programas de melhoramento, pois elevado número de genes equivale a maiores expectativas de combinações segregantes, o que resulta em um maior número de gerações para obtenção de um indivíduo homozigoto para o caráter.

A contribuição da herdabilidade (h^2) é de grande importância nos programas de melhoramento, pois mede a intensidade com que o fenotípico expressa o genótipo, ou seja, expressa a proporção da variância genética presente na variância fenotípica total (Bueno et al., 2001). É importante ressaltar que a herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) considera as variâncias genéticas aditivas e de dominância, sendo interessante destacar também que a herdabilidade de uma dada característica não é imutável, podendo variar de acordo com o controle ambiental, ou com o uso de populações segregantes, o que pode contribuir para sua redução (Ramalho et al., 1993).

Tabela 10 – Estimativa dos parâmetros genéticos obtidos na análise de reação à mancha-bacteriana com base na população F₂

| Parâmetros ¹ | Característica ² | |
|-------------------------|-----------------------------|-------|
| | RMB-1 | RMB-2 |
| σ_f^2 | 0,69 | 0,88 |
| σ_e^2 | 0,22 | 0,23 |
| σ_g^2 | 0,47 | 0,64 |
| h_a^2 | 68,13 | 73,54 |
| <i>gmd</i> | 0,92 | 0,92 |
| η | 1,78 | 1,40 |

¹ σ_f^2 = variância fenotípica, σ_e^2 = variância ambiental, σ_g^2 = variância genética, h_a^2 = herdabilidade no sentido amplo, *gmd* = grau médio de dominância e η = número de genes; ² RMB-1 = reação à mancha-bacteriana em população F₂ avaliada em março de 2005 e RMB-2 = reação à mancha-bacteriana em população F₂ avaliada em maio de 2006.

A herança da resistência à mancha-foliar de feosféria foi observada por meio de análise dialélica entre sete linhagens de milho, sendo as linhagens LA06, LA27 e LA30 consideradas resistentes, as linhagens LA67 e LA99 suscetíveis, e as linhagens LA55 e LA45 intermediárias, de acordo com a porcentagem de área foliar afetada pela feosféria. Em todos os cruzamentos envolvendo as linhagens resistentes, foram estimados altos valores de herdabilidade que, associados a elevados valores de variação fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$), sugerem a possibilidade de ganhos

genéticos mediante a seleção fenotípica de indivíduos resistentes à feosféria em gerações segregantes. Os dados observados nas linhagens avaliadas indicam a participação de pelo menos dois genes independentes na manifestação do caráter resistência à feosféria (Pegoraro et al., 2002).

Em estudo envolvendo a herança da resistência ao oídio em *Capsicum annum*, Blat (2004) constatou que, dentre a triagem de 156 acessos e posterior cruzamento entre resistentes e suscetíveis, a herança mostrou-se poligênica com elevado valor da herdabilidade, o que indica boa perspectiva de progresso seletivo. Os genitores resistentes apresentaram diferentes tipos de interação alélica para expressão da resistência, governada por pelo menos quatro pares de genes.

Em cruzamento envolvendo a cultivar de feijão-vagem 'Conquista Rasteiro', como genitor feminino, e a linhagem de feijão-comum H126, resistente à antracnose, como genitor masculino, Mariguele (2006) avaliou caracteres de interesse agrônômico para a cultura de feijão-vagem nas populações segregantes F_2 e linhas $F_{2,3}$, observando maior predomínio dos efeitos genéticos sobre os ambientais, com importância para os efeitos dominantes. Devido a baixos valores de herdabilidade na população da geração F_2 , não há expectativa de ganhos futuros em seleção individual de plantas, entretanto, para as linhas $F_{2,3}$, foram observados elevados valores de herdabilidade, indicando alta eficiência de seleção de famílias nas gerações segregantes pouco avançadas.

Com a finalidade de avaliar a herdabilidade, número de genes e ação gênica na herança do caráter resistência à raça IA-1abd de *Pyricularia grisea* de genótipos de arroz, Nunes et al. (2007) realizaram inoculação do fungo sobre as populações (P_1 , P_2 , F_1) e segregantes (F_2 , RC_1F_1 e RC_2F_1) obtidos a partir das cultivares BRS Atalanta, Fanny (suscetíveis), BRS 7 "Taim" e BRS Firmeza (resistentes). Os resultados encontrados pelos autores indicam que, para os cruzamentos envolvendo as cultivares "Taim" e BRS Firmeza para a raça IA-1abd, há dominância na ação gênica, com a presença de um gene dominante responsável pela expressão do caráter de resistência.

4.4.2. Reação à mancha-bacteriana com base nas 28 linhas F_3

As estimativas dos parâmetros genéticos obtidos na análise de resistência à mancha-bacteriana pelo registro de notas (RMB) e área abaixo da curva de

progresso da doença (AACPD), nas 28 linhas F₃ avaliadas, estão registradas na Tabela 11.

Para o coeficiente de determinação genotípica (H^2), foram observados valores de 66,92 e 69,02% para RMB e AACPD, respectivamente, indicando uma pequena influência das variações ambientais na expressão da resistência, denotando, mais uma vez, expectativa de ganhos em seleção de genótipos para as características avaliadas. Este fato é endossado pelo pequeno efeito da variação ambiental (σ_e^2) 0,03 e 1,05 em relação à variação fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$) 0,11 e 3,41 observada, respectivamente, em RMB e AACPD. Os resultados também indicam pouca influência ambiental na resistência, como discutido anteriormente, reforçando o resultado de análise da herança controlado por um gene dominante.

Apesar dos valores registrados para o índice de variação (I_v) apresentarem-se inferiores à unidade (0,44 e 0,47 para RMB e AACPD, respectivamente), este dado deve-se à análise de indivíduos já selecionados para a característica avaliada, expressando, em média, pequena variação genética para o caráter resistência.

Segundo Falconer e Mackay (1996), os parâmetros mais aplicados no melhoramento são as variâncias fenotípica e ambiental, a variabilidade genotípica, o coeficiente de determinação genotípica, o coeficiente de variação genotípica e índice de variação, sendo que há maiores possibilidades de ganhos quando se detectam índice de variação (I_v) superior à unidade e alta estimativa do coeficiente de determinação genotípica (H^2). Tais dados revelam uma avaliação mais precisa sobre o grau de variabilidade genética do material experimental, reforçando as possibilidades de ganhos futuros (Amaral Júnior, 1994).

O coeficiente de determinação genotípica (H^2) mede o quanto das diferenças fenotípicas inerentes ao caráter é devido às diferenças genotípicas entre os indivíduos, ou seja, a fração da variância fenotípica que se pode atribuir a causas genotípicas. Deste modo, o progresso na seleção pode ser predito com o conhecimento prévio desse coeficiente. Isto significa que se investigarmos as propriedades genéticas de uma população numa dada geração, no que diz respeito à sua variabilidade genética, pode-se inferir seu potencial para a seleção (Vencovsky e Barriga, 1992).

Tabela 11 – Estimativa dos parâmetros genéticos obtidos na análise de reação à mancha-bacteriana em 28 linhas F₃, por meio de notas (RMB) e cálculo de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)

| Parâmetros ¹ | Características ² | |
|-------------------------|------------------------------|-------|
| | RMB | AACPD |
| σ_f^2 | 0,11 | 3,41 |
| σ_e^2 | 0,03 | 1,05 |
| $\hat{\Phi}_G$ | 0,07 | 2,35 |
| H^2 | 66,92 | 69,02 |
| CV_g | 22,42 | 16,60 |
| I_v | 0,44 | 0,47 |

¹ σ_f^2 = variância fenotípica (média), σ_e^2 = variância ambiental (média), $\hat{\Phi}_G$ = variância genotípica (média), H^2 = coeficiente de determinação genotípica, CV_g = coeficiente de variação genética, I_v = índice de variação; ²RMB = reação à mancha-bacteriana, AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença.

Avaliando a resistência à mancha-bacteriana, Riva (2006) registrou valores de coeficiente de determinação genotípica (H^2) equivalentes a 71,95% para reação à mancha-bacteriana considerando notas, e 66,74% para AACPD; os mesmos caracteres apresentaram índice de variação (I_v) correspondente a 0,97 e 0,87.

Neves et al. (2003), avaliando o comportamento de progênies F₃ do cruzamento entre *Lycopersicon esculentum* cv. IPA-6 e *L. hirsutum* f. *glabratum* PI 134418 quanto ao ataque da traça-do-tomateiro, com base na determinação da área foliar danificada, número de tricomas tipo VI e o número de galerias por folíolo, detectaram valores para o coeficiente de determinação genotípica (H^2) superiores a 90% e magnitudes do índice de variação (I_v) superiores à unidade, indicando que métodos simples de melhoramento podem ser usados com a finalidade de obter ganhos.

A estimativa de parâmetros genéticos em uma população é de grande valia em programas de melhoramento genético, favorecendo a tomada de decisões relacionada com os métodos mais apropriados a serem utilizados, assim como a seleção de caracteres em etapas iniciais ou avançadas. Estas estimativas

são obtidas por meio de dados experimentais e refletem uma situação específica de ano e local, não podendo ser extrapoladas para outros ambientes (Rossmann, 2002).

4.4.3. Caracteres agronômicos – frutos

As estimativas dos parâmetros genéticos obtidos na análise de peso, comprimento e diâmetro médio de frutos, das 28 famílias F₃ previamente selecionadas para resistência à mancha-bacteriana, encontram-se na Tabela 12.

As características avaliadas obtiveram elevada magnitude do coeficiente de determinação genotípica (H^2), exibindo valores correspondentes a 91,75, 91,33 e 92,59% para PMF, CMF e DMF respectivamente. Conforme relatado anteriormente, esse dado sugere possibilidade de ganhos para as características em seleção de genótipos avaliados. Essas conclusões também são justificadas perante os resultados obtidos pela observação da pequena variação ambiental (σ_e^2) 3,71, 14,76 e 2,09 em relação à variação fenotípica (σ_f^2) 44,99, 170,42 e 28,23 para as respectivas características PMF, CMF e DMF, indicando pequena influência do ambiente nos efeitos observados em todas as características (Tabela 12).

Outro parâmetro importante refere-se ao índice de variação (I_V), o qual, juntamente com coeficiente de determinação genotípica (H^2), permite confirmar a possibilidade de ganhos genéticos futuros. Para as características avaliadas, esse índice apresentou valores superiores à unidade, sendo 1,05, 1,02 e 1,11 para PMF, CMF e DMF, respectivamente, indicando que a variação genética supera a variação devido a efeitos ambientais.

Os resultados obtidos para os parâmetros genéticos permitem supor possíveis ganhos de seleção para os caracteres PMF, CMF e DMF. Essas informações são importantes, pois, para o desenvolvimento de uma nova cultivar resistente à mancha-bacteriana, é necessário que outros atributos agronômicos estejam de acordo com as exigências dos produtores e consumidores, no que diz respeito à produtividade, tamanho e formato do fruto.

Tabela 12 - Estimativa dos parâmetros genéticos obtidos na análise de comprimento, diâmetro e peso médio de frutos obtidos de linhas F₃ e genitores UENF 1381 e ECW

| Parâmetros ¹ | Características ² | | |
|-------------------------|------------------------------|--------|-------|
| | PMF | CMF | DMF |
| σ_f^2 | 44,99 | 170,42 | 28,23 |
| σ_e^2 | 3,17 | 14,76 | 2,09 |
| $\hat{\Phi}_G$ | 57,94 | 191,01 | 65,96 |
| H^2 | 91,75 | 91,33 | 92,59 |
| CV_g | 38,76 | 20,48 | 25,57 |
| I_v | 1,05 | 1,02 | 1,11 |

¹ σ_f^2 = variância fenotípica (média), σ_e^2 = variância ambiental (média), $\hat{\Phi}_G$ = variância genotípica (média), H^2 = coeficiente de determinação genotípica, CV_g = coeficiente de variação genética, I_v = índice de variação; ²PMF = peso médio de fruto, CMF = comprimento médio de fruto e DMF = diâmetro médio de fruto

Elevados valores de coeficiente de determinação genotípica (H^2) (superiores a 94%) e índice de variação (I_v) superiores à unidade (acima de 2,1) foram observados por Amaral Júnior (1994), em estudo de divergência genética em moranga, confirmando a possibilidade de ganhos em futuros programas de melhoramento.

Carvalho et al. (2003), em avaliação de populações de milho, relataram que as magnitudes encontradas dos coeficientes de herdabilidade oscilaram de 40,02% a 48,59%, e índice de variação (I_v) apontou valores superiores à unidade, indicando uma situação mais favorável para a seleção.

Avaliando oito características, em dois níveis de fósforo, em relação a 19 genótipos de alface, Cock et al. (2003) estimaram alguns parâmetros genéticos de interesse sobre a estrutura genética da população, obtendo elevados valores de coeficiente de determinação genotípica e valores de índice de variação superiores à unidade em seis das oito características estudadas, fato este que confirma a possibilidade de obtenção de ganhos genéticos.

Estimativas de parâmetros genéticos de quatro características de linhas F₆, obtidas do cruzamento entre UENF 1421 x UENF 1381, revelaram valores de

índice de variação superiores à unidade e coeficiente de determinação genotípica variando de 75,94 a 91,59%, permitindo ganhos genéticos futuros em pimentão (Riva, 2006).

4.5. Análise molecular

Dos 458 iniciadores testados, 39 detectaram polimorfismo nos genótipos analisados (Tabela 13), ou seja, aproximadamente 8,5% mostraram-se úteis na discriminação molecular entre os genótipos.

Desses 39, um total de 20 iniciadores revelou polimorfismo com presença de banda em P_1 e ausência em P_2 , gerando 21 bandas polimórficas, registrando-se cerca de uma banda por iniciador, conforme observado na Figura 17, por meio do iniciador D11. Os outros 19 iniciadores revelaram polimorfismo caracterizado por ausência de banda em P_1 e presença em P_2 , gerando 21 bandas polimórficas e mantendo também a média de cerca de uma banda por iniciador, como exemplificado pelo iniciador M16 (Figura 18).

A ausência de detecção de um maior polimorfismo em nível molecular deve-se ao fato de que, embora contrastantes para diversas características importantes e marcantes (como a resistência à mancha-bacteriana, a presença e a ausência de capsaicinóides, o formato e o tamanho do fruto) os genitores estudados pertencem à mesma espécie: *Capsicum annuum* L.

Em estudos de divergência genética em 70 acessos de *Capsicum*, utilizando também a técnica de RAPD, conduzidos no mesmo laboratório, o número médio de bandas polimórficas por iniciador atingiu a marca de 12 bandas (Costa et al., 2006). Esse polimorfismo diz respeito a diferentes espécies de *Capsicum* e, nessa situação, espera-se a detecção de um maior polimorfismo.

Os iniciadores testados no presente estudo foram produzidos por duas companhias distintas: *Operon* (139 iniciadores) e *Gibco* (320). Dos 39 iniciadores que detectaram polimorfismo, apenas quatro (A2, R10, V6 e AW9) foram produzidos pela *Operon*, e os demais pela *Gibco*.

Tabela 13 – Iniciadores testados e iniciadores que geraram polimorfismo (em função do fabricante), entre os genitores e as gerações F₁ e F₂ do cruzamento entre UENF 1381 e ECW

| Operon | Iniciadores polimórficos | Gibco | Iniciadores polimórficos |
|-----------------|--------------------------|----------|---------------------------------|
| OPA1 a OPA10 | A2 | A1 a A20 | |
| OPA11 a OPA 20 | | B1 a B20 | |
| OPB1 a OPB5 | | C1 a C20 | C12, C15, C20, |
| OPB6 a OPB10 | | D1 a D20 | D1, D5, D6, D11, D13, D15 e D16 |
| OPC10 a OPC15 | | E1 a E20 | |
| OPC16 a OPC20 | | F1 a F20 | |
| OPD10 a OPD20 | | G1 a G20 | |
| OPE1 a OPE10 | | H1 a H20 | |
| OPF1 a OPF10 | | I1 a I20 | |
| OPR1 a OPR10 | R10 | J1 a J20 | J12, J13 e J20 |
| OPV1 a OPV10 | V6 | K1 a K20 | K8, K16, K17 e K20 |
| OPAA1 a OPAA7 | | L1 a L20 | L3 |
| OPAB1 a OPAB11 | | M1 a M20 | M10, M16 |
| OPAC1 a OPAC10 | | N1 à N20 | N1, N11, N14, N15, N16 e N20 |
| OPAG1 a OPAG 10 | | O1 à O20 | O7, O12, O15 e O20 |
| OPAW1 a OPAW10 | AW9 | P1 à P20 | P10, P13, P12, P15 e P17 |

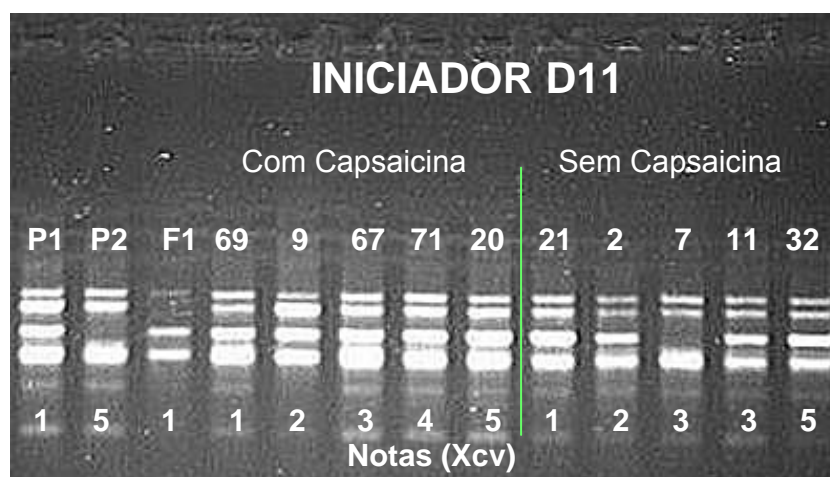


Figura 17 – Marcas geradas pelo iniciador D11, presença em P₁ e F₁, ausência em P₂ e distribuição desigual nos segregantes F₂.
Notas (Xcv): 1 e 2 = resistentes; 3, 4 e 5 = suscetíveis.

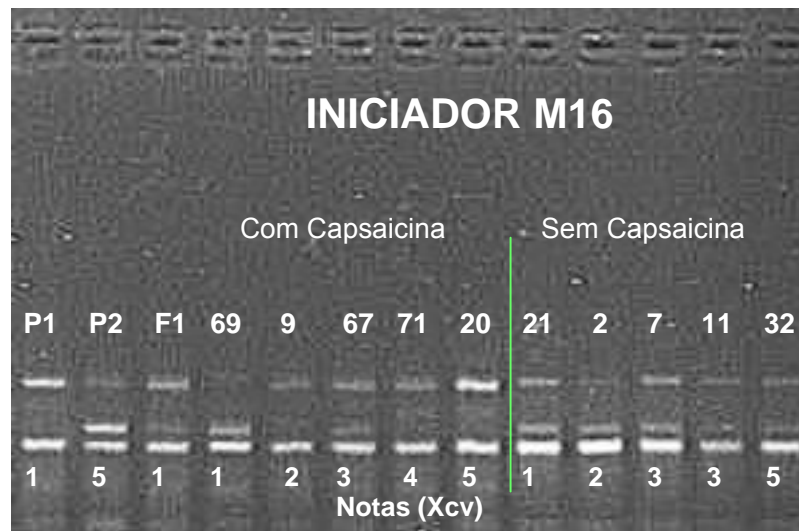


Figura 18 – Marcas geradas pelo iniciador M16, presença em P₂ e F₁, ausência em P₁ e distribuição desigual nos segregantes F₂.
Notas (Xcv): 1 e 2 = resistentes; 3, 4 e 5 = suscetíveis.

Ferreira et al. (1999), em trabalho semelhante, visando identificar marcadores ligados ao gene de resistência à mancha-angular (raça 63.39 de *P. griseola*) em feijão, realizaram estudo prévio da herança da resistência em populações derivadas dos cruzamentos entre Rudá (genitor suscetível) e MAR-2 (genitor resistente). Foi obtida a segregação de 3:1 (plantas resistentes:suscetíveis) na geração F₂; 1:1, no retrocruzamento com Rudá; e 1:0, no retrocruzamento com MAR-2, evidenciando a existência de um alelo dominante governando a resistência. Posteriormente, foram construídos *bulks* (grupos) de DNA, de indivíduos F₂ resistentes e suscetíveis à raça 63.39 do patógeno, amplificados por meio de 400 iniciadores, dos quais apenas nove eram heteromórficos. Entre estes, o iniciador OPE-04 amplificou uma banda de aproximadamente 500 pb, que, testada nos indivíduos dos grupos (resistente e suscetível), esteve presente em todos os indivíduos resistentes e ausente em todos os suscetíveis, seguindo a segregação na proporção de 3:1 (plantas resistentes:plantas suscetíveis) na população F₂ constituída de 158 plantas. Este estudo evidencia a possibilidade de uso da técnica RAPD na identificação de marcadores ligados à resistência a doenças.

Pinto et al. (2007), trabalhando com SSR, concluíram que não houve relação entre o padrão de segregação de seqüências microssatélites e a resistência ao bicho-mineiro em plantas de café, já que não se verificou nenhum polimorfismo co-segregante com a característica de resistência. Neste caso, a

seleção assistida por EST-SSR não se mostrou eficiente em populações avançadas de cafeeiro.

Com o auxílio de marcadores moleculares RAPD, foram estudadas 154 linhas endogâmicas recombinantes (RIL's), obtidas do cruzamento entre as cultivares Ouro Negro e Rudá de feijão, quanto à organização de diferentes genes de resistência à ferrugem, antracnose e mancha-angular. Amostras de DNA de cada uma das RIL's foram amplificadas, via PCR, utilizando 70 iniciadores diferentes. A análise da segregação da resistência às doenças na população revelou diferentes modos de herança para a resistência a cada uma das raças fisiológicas estudadas. Foi possível estimar que a utilidade dos marcadores RAPD, previamente identificados como ligados a genes de resistência do feijoeiro, foi restrita, pois somente cinco foram validados como ligados aos genes de resistência à ferrugem e à antracnose. Três novos marcadores (OBA16₆₆₉ e OBA16₅₈₃ a 10,4 cM em acoplamento e OAD9₃₂₁₀ a 13,9 cM em repulsão) ligados ao bloco gênico de resistência da cultivar Ouro Negro à mancha-angular foram identificados (Faleiro et al., 2003).

O polimorfismo observado no presente trabalho não teve relação nem com o gene de resistência à mancha-bacteriana nem com a presença ou ausência de capsaicina, características essas controladas por um gene dominante. Novamente, pode-se atribuir isso ao número de iniciadores testados, que pode ter sido insuficiente para detecção de uma marca associada aos referidos genes, principalmente em função do tamanho do genoma de *Capsicum annuum* L.

Considerando que os genitores pertencem à mesma espécie e que o tamanho do genoma de *Capsicum annuum* é de cerca de 3 Mpb (Moscone et al., 2003), ou seja, três vezes o tamanho do genoma do tomateiro (Lee et al., 2007), pelo menos duas estratégias poderiam ser sugeridas para aumentar o nível de detecção de polimorfismo e, possivelmente, encontrar uma marca associada ao gene de resistência: aumentar o número de iniciadores testados no RAPD ou utilizar uma outra técnica molecular mais eficiente na detecção de polimorfismo, como AFLP, RFLP ou os microsatélites (Ferreira, 2003).

Estudos envolvendo marcadores de DNA e o gene C, que determina a presença de capsaicina nos frutos de pimenta, vêm sendo desenvolvidos (Lee et al., 2005), inclusive iniciadores capazes de identificar a presença desse gene já foram propostos (Kim et al., 2001; Lee et al., 2005). Por meio da técnica RFLP, o

gene *C* foi identificado no cromossomo 2 (Blum et al., 2002; Lefebvre et al., 2002). Sabendo que os genitores UENF 1381 e ECW são contrastantes em relação a essa característica, esse fato foi utilizado, no presente estudo, na tentativa de verificar se marcas ligadas à capsaicina poderiam também estar associadas ao gene de resistência à mancha-bacteriana, descrito neste trabalho. Esse gene de resistência, ao contrário do observado para o gene *C*, ainda não está descrito e tem, neste estudo, seu primeiro relato. Com os resultados obtidos neste trabalho, nada se pode concluir em relação à associação de marcas entre o gene *C* e o gene de resistência. Deste modo, outros experimentos em casa de vegetação (obtenção das gerações RC₁ e RC₂) e em laboratório (uso de novos iniciadores e/ou de outras técnicas moleculares) deverão ser conduzidos para permitir uma caracterização mais completa do novo gene.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A obtenção de cultivares resistentes à mancha-bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) em pimentão e pimentas é um dos desafios constantes dos melhoristas de hortaliças. Com o objetivo de se estudar a herança da resistência a uma nova raça desta bactéria (P6), considerando aspectos clássicos e moleculares, foram instalados dois experimentos em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), em delineamento inteiramente casualizado. A herança da resistência foi avaliada durante duas épocas, nos genitores UENF 1381 (pimenta resistente) e ECW (pimentão suscetível), híbridos F₁ e 84 indivíduos F₂ no primeiro experimento e 40 indivíduos no segundo. Foram também testadas linhas F₃ oriundas de seleção de indivíduos F₂ resistentes. A inoculação foi efetuada utilizando-se uma suspensão bacteriana na concentração de células ajustadas para 10⁵ ufc/ml. Nos dois experimentos, a inoculação da raça P6 foi realizada 50 dias após a sementeira, em folhas jovens e saudáveis, por meio de infiltração da suspensão bacteriana no mesófilo foliar, com auxílio de seringa hipodérmica, encharcando uma área de aproximadamente 1,0 cm². As avaliações obedeceram a uma escala de notas com valores de 1 a 5, conferindo-se notas 1 e 2 às plantas resistentes e notas 3, 4 e 5 às suscetíveis. A avaliação teve início no quinto dia após a inoculação e foi repetida a cada dois dias, até o décimo terceiro dia. Três características agronômicas também foram avaliadas nas linhas

F₃, quais sejam, o peso médio de frutos, o comprimento médio de frutos e o diâmetro médio de frutos.

A herança da pungência também foi estudada, considerando-se os genitores, F₁, os indivíduos F₂ e as linhas F₃ selecionadas. A avaliação da presença ou ausência de capsaicinóides foi feita por meio de reação da placenta dos frutos na presença do reagente vanadato de amônio.

Os parâmetros genéticos para resistência à mancha-bacteriana, obtidos na análise envolvendo a população F₂, apresentaram elevados valores de herdabilidade no sentido amplo (h_a^2), os quais, associados a um pequeno efeito das variações ambientais, indicam expectativa de possíveis ganhos em seleção de genótipos. A dominância parcial foi observada na interação alélica presente, sendo controlada por um gene, como mencionado anteriormente.

Entre as 28 linhas F₃ avaliadas para análise de resistência à mancha-bacteriana pelo registro de notas (RMB) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), bem como os caracteres PMF, DMF e CMF, foram observados elevado valor para o coeficiente de determinação genotípica (H^2) e pouca influência ambiental, denotando a expectativa de possíveis ganhos em seleção de genótipos para os caracteres em questão.

Análise molecular com base em marcadores RAPD foi também conduzida com as populações P₁, P₂, F₁ e F₂, testando-se 458 iniciadores para detecção de polimorfismo associado à resistência e à pungência. Trinta e nove iniciadores revelaram polimorfismo. Entretanto, as marcas polimórficas não mostraram qualquer relação com a resistência ou com a pungência dos frutos.

Concluiu-se que tanto a resistência à mancha-bacteriana, raça P6, quanto a pungência são controladas por um gene dominante no cruzamento envolvendo ECW x UENF 1381. O fato de que se observaram 20 linhas F₃ pungentes e não-pungentes resistentes leva à conclusão de que será possível a obtenção de linhagens de pimentão e pimentas com resistência à mancha-bacteriana, com o avanço das gerações. Considerando-se a resistência e a ausência de pungência, associadas aos resultados obtidos para produção (peso médio de frutos), comprimento e diâmetro médio dos frutos, as linhas F₃ mais promissoras foram 2, 11, 19 e 26. Em termos de pimenta, considerando-se os mesmos critérios, as linhas mais promissoras foram 17, 21 e 25.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamson, W.C., Sowell Jr. G. (1982) Inheritance of bacterial spot resistance in pepper. *HortScience*, 18 (6):905–906.
- Aguiar, L.A., Kimura, O., Castilho, A.M.C., Castilho, K.S.C., Ribeiro, R.L.D., Akiba, F., Carmo, M.G.F. (2003) Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 21 (1):44-50.
- Aluru, M.R., Mazourek, M., Landry, L.G., Curry, J., Jahn, M., O'Connell, M.A. (2003) Differential expression of fatty acid synthase genes, Acl, Fat and Kas, in Capsicum fruit. *Journal of Experimental Botany*, 54 (388):1655-1664.
- Alzate-Marin, A.L., Cervigni, G.D.L., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2005) Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia brasileira*, 30 (4):333-342.

- Alzate-Marin, A.L.A. (2003) Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes. *Scientia Agricola*, Piracicaba, 60 (2):283-290.
- Alzate-Marin, A.L., Arruda, M.C.C., Menarim, H., Chagas, J.M., Barros, E.G., Moreira, M.A. (1999) Identification of rapd markers linked to resistance genes to anthracnose in common bean cultivars ab 136, to and g 2333. *Annual Report of The Bean Improvement Cooperative*, 42:13–14.
- Amaral Júnior, A.T. (1994) *Análise enzimática e isoenzimática da divergência genética entre acessos de moranga (Curcubita maxima Duchesne)*. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 95p.
- Andrade, A.E., Felix, G.C., Oliveira, A.C., Noronha, E.F., Pereira, J.L., Lima, L.H.C., Rosato, Y.B., Melo, J.A.T., Bloch Júnior, C., Mehta, A. (2005) *Expressão diferencial de proteínas de Xanthomonas campestris pv campestris na interação com a planta hospedeira Brassica olearacea*. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. n. 93, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22p.
- Barbero, G.F., Palma, M., Barroso, C. (2006) Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (9):3231-3236.
- Blat, S.F. (2004) *Herança da reação de Capsicum spp. ao oídio (Leveillula taurica (LEV.) ARN.)*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo – USP, 165p.
- Blum, E., Liu, K., Mazourek, M., Yoo, E.Y., Jahn, M., Paran, I. (2002) Molecular mapping of the C locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome*, 45 (4):702–705.

- Bongiolo Neto, A., Reifschneider, F.J.B., Takatsu, A. (1986) Levantamento de grupos de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 11:881–889.
- Bosland, P.W. (1996) Capsicum: Innovative uses of ancient crop. In: Janick, J. (ed.) *Progress in new crops*. Arlington, VA: ASHS Press, p. 479–487.
- Bueno, L.C.S., Mendes, A.N.G., Carvalho, S.P. (2001) *Melhoramento genético de plantas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 282p.
- Campbell, C.L., Madden, L.V. (1990) Monitoring epidemics. In: *Introduction plant disease epidemiology*. p. 107-128.
- Campos, K.P. (2006) *Obtenção, caracterização molecular, morfológica e reprodutiva de híbridos entre espécies de Capsicum*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 120p.
- Carmo, M.G.F., Kimura, O., Maffia, L.A., Carvalho, A.O. (1996) Progresso da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em condições de viveiro. *Fitopatologia Brasileira*, 21 (1):62-70.
- Carrijo, I.V. (1991) 'Jumbo AG-592': nova cultivar de tomate. *Horticultura Brasileira*, 9 (2): 97.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B., Henz, G.B. (2003) Germoplasm collection of *Capsicum* spp. maintained by Embrapa Hortaliças (CNPq). *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 22:17-20.
- Carvalho, H.W.L., Silva, M.L.L., Santos, M.X.S., Souza, E.M.S. (2003) Estimativas de parâmetros genéticos na população de milho CPATC-3 em dois locais de Sergipe. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 38 (1):73-78.

- Carvalho, J.W.A., Maluf, W.R., Figueira, A.R., Gomes, L.A.A. (1999) Obtenção de linhagens de tomateiro de crescimento determinado com resistência múltipla a nematóides de galhas e a tospovírus. *Ciência agrotecnologia*, Lavras, 23 (3):593-607.
- Casali, V.W.D. (1970) *Cruzamento interespecífico no gênero Capsicum*. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 58p.
- Casali, V.W.D., Couto, F.A.A. (1984) Origem e botânica de *Capsicum*. *Informe Agropecuário*, 10 (113):76–78.
- Ceruti, F.C., Lazzar, S.M.N. (2003) Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47 (3):447-453.
- Cock, W.R.S., Tardin, F.D., Amaral Júnior, A.T., Scapim, C.A., Amaral, J.F.T., Cunha, G.M.C., Bressan-Smith, R.E., Pinto, R.J.B. (2003) Seleção de genótipos de alface eficientes na absorção do fósforo. *Acta scientiarum*, Maringá, 25 (1):59-64.
- Corrêa, R.X., Good-god, P.I.V., Oliveira, M.L.P., Nietzsche, S., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2001) Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. *Fitopatologia Brasileira*, 32:26-27.
- Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Vitória, A.P., Campos, K.P., Rodrigues, R., Silva, D.H., Pereira, M.G. (2006) Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6:18-23.
- Costa, R.A. (2000) *Análise genética de produção, características de fruto e reação à mancha-bacteriana em genótipos de pimentão (Capsicum annuum L.)*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 67p.

- Costa, R.A., Rodrigues, R., Sudré, C.P. (2002) Resistência genética à mancha bacteriana em genótipos de pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20 (1):86–89.
- Cruz, C.D. (2006) *Programa Genes: Estatística experimental e matrizes*. Viçosa: Editora UFV, 285p.
- Cruz, R.P., Federizzi, L.C., Milach, S.C.K. (2001) Genética da resistência à ferrugem-da-folha em aveia. *Pesquisa da agropecuária brasileira*, Brasília, 36 (9):1127-1132.
- Derera, F. (2000) *Condiment Paprika: Breeding, Harvesting & Commercialisation*. 33p.
- DeWitt, D., Bosland, P.W. (1997) *Peppers of the World: an identification guide*. California: *Ten Speed Press*, 219p.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 (27):13–15.
- Echer, M.M., Costa, C.P. (2002) Reaction of sweet pepper to the *potato virus Y* (PVY^m). *Scientia agricola*, Piracicaba, 59 (2):309-314.
- Echer, M.M., Fernandes, M.C.A., Ribeiro, R.L.D., Peracchi, A.L. (2002) Avaliação de genótipos de *Capsicum* para resistência ao ácaro branco. *Horticultura Brasileira*, 20 (2):217-221.
- EMBRAPA. Pimentas; <http://www.pepedesign.com/pimenta.php> em 05/01/07.
- EPPO. Quarantine pest: *Xanthomonas vesicatoria*, EPPO A2 list: (157):6.
- Eshbaugh, W. (1964) *A numerical taxonomic and cytogenetic study of certain species of the genus Capsicum*. (Ph.D. thesis) - Indiana University, 112p.

Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. (1996) *Introduction to quantitative genetics*. 4. ed. London: Longman, 463p.

Faleiro, F.G., Schuster, I., Ragagnin, V.A., Cruz, C.D., Corrêa, R.X., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2003) Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 38 (12):1387-1397.

FAO-FAOSTAT. Situação das hortaliças no Brasil, 1980-2005; <http://www.apps.fao.org> em 03/04/06.

Ferreira, C.F., Borém, A., Carvalho, G.A., Nietsche, S., Júnior, T.J., Barros, E.G., Alves, M. (1999) Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. *Bragantia*, Campinas, 58 (2):247-252.

Ferreira, M.A.J. F. (2003) *Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas*. Boa Vista: Embrapa Roraima, 63p.

Ferreira, M.E., Grattaplagia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas*. 3 ed. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, 22p.

Filgueira, F.A.R. (2000) *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 402p.

Filho, H. Pimentas; <http://www.geocities.com/NapaValley/1819/index.htm> em 23/10/04.

Filho, H. Química das pimentas; <http://www.geocities.com/NapaValley/1819/quimica.htm> em 03/05/06.

- Fiori, M.P. (2006) *Comportamento de cultivares de tomateiro quanto à utilização de escórias siderúrgicas em ambiente protegido*. Dissertação (Mestre em Agronomia) - Marília – SP, Universidade de Marília – Unimar, 44p.
- Fontes, R.R. (2003) *Apresentação*. In: *Doenças do pimentão: diagnose e controle*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 96p.
- Gomes, F., Garcia, C.H. (2002) *Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais*. Piracicaba: FEALQ, 309p.
- Gonçalves, P.A.S., Silva, C.R.S., Boff, P. (2004) Incidência do míldio em cebola sob adubação mineral e orgânica. *Horticultura Brasileira*, 22 (3):538-542.
- Guedes, L., Guimarães, P.M., Bertoli, D.J., Fávero, A.P., Leal-Bertoli, S.C.M. (2005) Utilização de CDNA-AFLP para análise de expressão de *Arachis stenosperma* em resposta à infecção de *Puccinia Arachides* e *Cercosporium personatum*. *45º Congresso Brasileiro de Olericultura*, Fortaleza: Revista Horticultura Brasileira, Brasília, v. 23, p. 368.
- Harvell, K., Bosland, P.W. (1997) The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *HortScience*, 32:1292.
- History Vavilov; http://www.vir.nw.ru/history/vav_sp.htm espécies em 26/10/04.
- IBGE Censo Agropecuário. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA; <http://www.sidra.ibge.gov.br> em 05/05/06.
- Jarret, R.L., Antonious, G.F. (2006) Screening *Capsicum* Accessions for Capsaicinoids Content. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. *Journal of Environmental Science and Health*, 41 (5):717–729.

- Jones, J.B., Minsavage, G.V., Roberts, P.D., Johnson, R.R., Kousik, C.S., Subramanian, S., Stall, R.E. (2002) A non-hypersensitive resistance in pepper to the bacterial spot pathogen is associated with two recessives genes. *Phytopatology*, 92 (3):273-277.
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W. (2004) Reclassification of the *xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *System. Appl. Microbiol.* (27):755-762.
- Jones, J.B., Stall, R.E., Bouzar, H. (1998) Diversity among *xanthomonads* pathogenic on pepper and tomato. *Phytopathol.* 16:41-58.
- José, A.C.V.F., Bertioli, D.J., Guimarães, P.M., Leal-Bertioli, S.C.M. (2005) Desenvolvimento de marcadores moleculares RGAs para espécie silvestre de *Arachis*. *Resumos EMBRAPA*, Brasília, p. 149.
- Juhász, A.C.P. (2002) *Herança da resistência à mancha-bacteriana em pimentão e avaliações estruturais associadas à interação Xanthomonas axonopodis pv vesicatoria – Capsicum annuum L.* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 86p.
- Kim, M., Kim, S., Kim, S., Kim, B. (2001) Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Mol. Cells*, 11 (2):213-219.
- Kimura, O., Carmo, M.G.F. (1996) Doenças causadas por bactérias em pimentão. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 8 (184):66–73.
- Kousik, C.S., Ritchie, D.F. (1996) Disease potential of pepper bacterial spot pathogen races that overcome the *Bs2* gene for resistance. *Phytopathology*, 86 (12):1336 -1343.

- Kousik, C.S., Ritchie, D.F. (1998) Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes. *Plant disease*, 82 (2):181-186.
- Kousik, C.S., Ritchie, D.F. (1999) Development of bacterial spot on near-Isogenic lines of bell pepper carrying gene pyramids composed of defeated major resistance genes. *Phytopathology*, 89 (11):1066-1072.
- Kurosawa, C., Pavan, M.A. (1997) Doenças das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamim Filho, A.B., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. (eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. v. 2. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 665–675.
- Lee, C., Yoo, E., Shin, J.H., Lee, J., Hwang, H., Kim, B. (2005) Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the capsaicinoid synthetase gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Mol. Cells*, 19 (2):262-267.
- Lee, S., Jo, S.H., Choi, D. (2007) Solanaceae genomics: Current status of tomato (*Solanum lycopersicum*) genome sequencing and its application to pepper (*Capsicum* spp.) genome research. *Plant Biotechnology*, 24:11–16.
- Lefebvre, V., Pflieger, S., Thabuis, A., Caranta, C., Blattes, A., Chauvet, J.C., Daubèze, A.M., Palloix, A. (2002) Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome*, 45:839–854.
- Leonardo, E.F., Abbud, D.M., Fernandes, M. F. O uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas; <http://www.usp.br/siicusp/8osiicusp/resumos/ficha879.htm> em 26/10/00.
- Lobo, V.L.S., Giordano, L.B., Lopes, C.A. (2005) Herança da resistência à mancha-bacteriana em tomateiro. *Fitopatologia brasileira*, 30 (4):343-349.

- Lopes, C.A., Ávila, A.C. (2003) *Doenças do pimentão: diagnose e controle*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 96p.
- Magalhães, F.B., Campos, P., Quirino, B.F., Lopes, C.A., Bezerra Agasie, I.C. (2005) Uso de marcadores moleculares para estudo da variação genética natural de *Arabidopsis thaliana* visando à resistência à *Ralstonia solanacearum* e outros patógenos. *Resumos EMBRAPA*, Brasília, p. 120.
- Mapa. Produção de hortaliças no Brasil, 1980-2005; <http://www.agricultura.gov.br/> em 05/01/07.
- Marcussi, F.F.N., Godoy, L.J.G., Villas-Bôas, R.L. (2004) Fertirrigação nitrogenada e potássica na cultura do pimentão baseada no acúmulo de N e K pela planta. *Irriga*, Botucatu, 9 (1):41-51.
- Mariguele, K.H. (2006) *Controle genético da qualidade da vagem em cruzamento de feijão-vagem x feijão-comum*. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento de plantas) - Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 20p.
- Marin, A.L.A., Costa, M.R., Menarin, H. (2003) Herança da resistência à antracnose na cultivar de feijoeiro comum Cornell 49-242. *Fitopatologia brasileira*, 28 (3):302-306.
- Marques, J.M., Ferreira, M.A., Ribeiro, C.S.C., Moretzsohn, M.C., Amaral, Z.P.S., Buso, G.S.C. (2005) Construção de mapa genético para *Capsicum annum* utilizando marcadores microssatélites. *45º Congresso Brasileiro de Olericultura*, Fortaleza. *Revista Horticultura Brasileira*, Brasília, 23:368.
- Martines, A.M., Agostine, E.S., Lima, V.N. AGROPAGE; <http://www.agropage.hpg.ig.com.br/diversos/midoencas.htm> em 02/05/05.

- Mehta, Y.R., Arias, C.A.A. (2001) Herança da resistência à *Stemphylium solani* e insensibilidade a sua fitotoxina em cultivares de algodoeiro. *Fitopatologia brasileira*, 26 (4).
- Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B., Stall, R.E. (1990) Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* – pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:41-47.
- Moscone, E.A., Baranyi, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Eherendorfer, F., Hunziker, A.T. (2003) Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Annals of Botany*, 92:21–29.
- Neves, L.G., Leal, N.R., Rodrigues, R., Pereira, N.E. (2003) Estimativa de parâmetros genéticos e correlação entre componentes de resistência à traça-do-tomateiro em progênes de *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* f. *glabratum*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 21 (3):458-461.
- Noda, H., Machado, F.M., Martins, A.L.U. (2003) Seleção de genótipos de pimentão resistentes a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. sob condições naturais de infecção. *Acta Amazônica*, 33 (3):371-380.
- Nunes, C.D.M., Carvalho, F.I.F., Pierobom, C.R., Oliveira, A.C. (2007) Genética da resistência de cultivares de arroz à raça IA-1 de *Pyricularia grisea*. *Fitopatologia Brasileira*, 32 (1):64-69.
- O Agrônomo (2002) v. 54, n.1, Campinas.
- Oliveira, M.S.P., Maués, M.M., Kalume, M.A.A. (2001) Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. *Acta Botânica Brasílica*, São Carlos, 15 (1):63-67.
- Pádua, J.G., Casali, V.W.D., Pinto, C.M.F. (1984) Efeitos climáticos sobre pimentão e pimenta. *Informe Agropecuário*, 10 (113):11-13.

- Paran, I., Voort, J.R., Lefebvre, V., Jahn, M., Landry, L., Schriek, M., Tanyolac, B., Caranta, C., Chaim, A.B., Livingstone, K., Palloix, A., Peleman, J. (2004) A complete integrated map of pepper. *Molecular breeding*, 13 (3):251-261.
- Parrella, G., Ruffel, S., Moretti, A., Morel, C., Palloix, A., Caranta, C. (2002) Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor. Appl. Genet.* 105 (6-7):855-861.
- Passini, A. (2002) *Desenvolvimento e aperfeiçoamento de metodologias analíticas para identificação e quantificação de capsaicinóides em pimenta do gênero Capsicum*. Tese (Mestrado em Química de produtos naturais) – Rio de Janeiro – RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, 144p.
- Pegoraro, D.G., Neto, J.F.B., Dal Soglio, F.K., Vacaro, E., Nuss, C.N., Conceição, L.D. (2002) Herança da resistência à mancha-foliar de feosféria em milho. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 37 (3):329-336.
- Pernezny, K., Momol, T. (2005) Florida plant disease management guide: Pepper. *University of Florida – Ifas Extension*, 1 – 4.
- Pickersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T., Gupta, P.K. (eds.) *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. Part B. Amsterdam: Elsevier, p. 139-160.
- Pickersgill, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96 (1):129-133.
- Pierre, M., Noël, L., Lahaye, T., Balivora, A., Veuskens, J., Ganal, M., Bonas, U. (2000) High-resolution genetic mapping of the pepper resistance locus *Bs3* governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* *AvrBs3* Protein. *Theor. Appl. Genet.* 101:255–263.

- Pimentel-Gomes, F. (2000) *Curso de estatística experimental*. 14 ed.: ESALQ, 477p.
- Pinto, F.O., Maluf, M.P., Guerreiro-Filho, O. (2007) Study of simple sequence repeat markers from coffee expressed sequences associated to leaf miner resistance. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (3):377-384.
- Prestes, A.M., Goulart, L.R. (1995) *Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas*. RAPP 3: 315-363.
- Ramalho, M.A.P., Santos, J.B., Zimmermann, M.J.O. (1993) *Genética quantitativa em plantas autógamas*. Goiânia: UFG, 271p.
- Reda, S.Y. (2004) *Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico*. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Ponta Grossa – PR, Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, 153p.
- Reifschneider, F.J.B. (2000) *Capsicum: pimentos e pimentos no Brasil*. Brasília: Embrapa, 113p.
- Reifschneider, F.J.B., Lopes, C.A. (1997) Resistências de plantas a fitobactérias. *Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, Poços de Caldas: SBF, v. 30, p. 41–46.
- Revers, L.F.X. Biologia molecular e biotecnologia da videira: aplicações e potencialidades; Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia. <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/cbve10/cbve10-palestra10.pdf> em 03/05/06.
- Ribeiro, A. (1997) *Herança da pungência em Capsicum chinense JACQ*. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 77p.

- Ribeiro, C.S.C., Cruz, R. (2003) Tendências de mercado: comércio de sementes de pimentão está em expansão. Apenas o mercado nacional movimentou US\$ 1,5 milhão. *Revista Cultivar*, EMATER DF, n. 20.
- Ribeiro, C.S.C. (2006) Cultivo do pimentão; http://www.apta regional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=438 em 24/11/06.
- Riva, E.M. (2002) *Análise de gerações para reação à mancha bacteriana e outros caracteres agrônomicos em Capsicum annum L.* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 91p.
- Riva, E.M. (2006) *Uso de métodos genealógicos e Single Seed Descent (SSD) para obtenção de linhas de pimentão resistentes à mancha bacteriana.* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 106p.
- Riva, E.M., Rodrigues, R., Pereira, M.G., Sudré, C.P., Karasawa, M., Amaral Júnior, A.T. (2004) Inheritance of bacterial spot disease in *Capsicum annum L.* *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4 (4):490-494.
- Rodrigues Neto, J., Malavolta Júnior, V.A., Victor, O. (1986) Meio Simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, Campinas, 12 (1/2):16.
- Rossmann, H. (2002) *Estimativa de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos.* Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas) – Piracicaba - SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 62p.
- Sabatini, G. (2003) Técnicas moleculares no diagnóstico de resistência. *Biológico*, São Paulo, 65 (1/2):29-32.

- Sacchi, H., De Melo, A.M.T., Colariccio, A. (2003) Reação de progênies de pimentão ao potato vírus Y. *Bragantia*, Campinas, 62 (1):53-60.
- Sahin, F., Miller, S.A. (1995) First report of pepper race 6 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant disease*, 79:1188.
- Sahin, F., Miller, S.A. (1998) Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper race 6. *Plant disease*, 82 (7):794–799.
- Santos, R.P., Carmo, M.G.F., Parraga, M.S., Macagnan, D., Lopes, C.A. (2004) Avaliação de cultivares de mandioca, para consumo *in natura*, quanto à resistência à mancha parda da folha. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 22 (2):232-237.
- Scott, A.J., Knott, M. (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30 (3):507-512.
- Siqueira, W.J., Fonseca, M.I.S., Sondhal, M.R. (1998) Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura *in vitro*. *Bragantia*, Campinas, 47 (1):1-8.
- Smith, P.G., Heiser, C.B. (1957) Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* L. *Am. Jour. Bot.* 62-68.
- Smith, R., Hartz, T., Aguiar, J., Molinar, R. (1998) Chile pepper production in California. *Vegetable Research and Information Center*, 4p.
- Souza, J.C., Duarte, J.M. (2002) Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis*. *Ciência agrotecnologia*, Lavras, 26 (2):325-331.

- Souza, W.L. Avaliação da resistência a *Oidiopsis taurica*, em genótipos de pimentão; http://www.apta regional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=438 em 24/11/06.
- Sudré, C.P. (2003) *Divergência Genética e Avaliação da Resistência à Mancha bacteriana em Capsicum spp.* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 112p.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall, R.E., Staskawicz, B.J. (1998) Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:14153-14158.
- Tong, N., Bosland, P.W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109:71–77.
- Torres, J.C., Ventura, J.A. (1991) AVACPD: um programa para calcular a área e o volume abaixo da curva de progresso da doença. *Fitopatologia Brasileira*, 16 (2):207.
- Torres, A.C., Buso, J.A. (1999) Novos desenvolvimentos na biotecnologia vegetal. In: Pagliano, D. (org.) *Calidad genética y sanitaria: un instrumento para la competitividad de la cadena agroindustrial*. Montevideo, Procisur, p. 3-12.
- Van Creijl, M.G.M., Kerckhoffs, D.M.F.J., Van Tuyl, J.M. (1997) Interspecific crosses in the genus *Tulipa* L.: identification of pre-fertilization barriers. *Sex Plant Reprod.* 10:116-123.
- Vencovsky, R., Barriga, P. (1992) Genética biométrica no fitomelhoramento. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 496p.
- Vernet, E. (2006) Polinização e criação de variedades; <http://www.planetaorganico.com.br/kokopellisite2.htm> em 26/10/06.

- Viñals, F.N., Ortega, R.G., Garcia, J.C. (1996) *El cultivo de Pimientos, chiles y ajies*. Madri: Ediciones Mundi-Prensa. 607p.
- Wagner, C.M. (2003) *Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto: implicações no melhoramento de uma população de Capsicum annuum L.* Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Piracicaba - SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 104p.
- Wierzbick, R. (2003) *Identificação de raças de Xanthomonas spp. patogênicas a pimentão no Estado de São Paulo*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Piracicaba - SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 62p.
- Wangsomboondee, T. (2002) *Competitiveness and Aggressiveness of Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria with Mutations in avrBs2 Locus*. (PhD thesis) - North Carolina State University, N.C.S.U., 58p.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Do, J.W., Park, H.G. (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interespecific hybridization between *Capsicum annuum* and *Capsicum baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breeding Science*, Washington, 56:31-38.
- Yu, Z.H., Wang, J.F., Stall, R.E., Vallejos, C.E. (1995) Genomic Localization of Tomato Genes That Control a Hypersensitive Reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Doidge) Dye. *Genetics*, 141:675–682.