

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Variabilidade Genética E Reação A Doenças Em Acessos De *Capsicum*
*baccatum***

Aurélio Ludovico De Almeida Martinez

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**Variabilidade Genética E Reação A Doenças Em Acessos de *Capsicum
baccatum***

Aurélio Ludovico de Almeida Martinez

Sob a Orientação do Professor
João Sebastião de Paula Araújo

e Co-orientação do pesquisador
Francisco José Becker Reifschneider

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia, Área de Concentração em
Produção Vegetal.

Seropédica-RJ

Julho de 2014

641.3384

M385v

T

Martinez, Aurélio Ludovico de Almeida, 1977-
Variabilidade genética e reação a doenças
em acessos de *Capsicum baccatum* / Aurélio
Ludovico de Almeida Martinez - 2014.

67 f.: il.

Orientador: João Sebastião de Paula
Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Fitotecnia.

Inclui bibliografias.

1. Pimenta - Teses. 2. Recursos do
germoplasma - Teses. 3. Viroses de plantas -
Teses. 4. Antracnose - Teses. I. Araújo, João
Sebastião de Paula, 1969-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Fitotecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

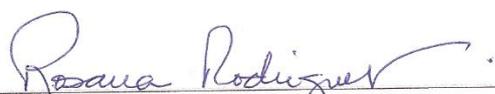
AURÉLIO LUDOVICO DE ALMEIDA MARTINEZ

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal.

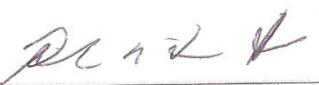
Tese aprovada em ___ / ___ / ____.


João Sebastião de Paula Araújo. *DSc.*, UFRRJ
(Orientador)


Cláudia Silva da Costa Ribeiro, *PhD.*, Embrapa Hortaliças
(Membro da banca)


Rosana Rodrigues. *DSc.*, UENF
(Membro da banca)


Margarida Gorete Ferreira do Carmo. *DSc.*, UFRRJ
(Membro da banca)


Raul de Lucena Duarte Ribeiro, *PhD.*, UFRRJ
(Membro da banca)

DEDICATÓRIA

À Danielly Isabel Rodrigues, minha amada esposa e companheira,
e aos meus pais Maria de Lourdes e Tomas Daniel,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal Goiano pelo incentivo e apoio na realização desse curso de pós-graduação.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela parceria e valentia na condução desse curso pelo programa Dinter/Capes.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa pelo apoio intelectual, financeiro e técnico em todas as etapas da realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Francisco José Becker Reifschneider, grande mentor, articulador e incentivador das atividades de pesquisa desenvolvidas nesse trabalho, por quem tive privilégio de ser co-orientado.

Ao prof. Dr. João Sebastião de Paula Araújo, pelas orientações, amizade, confiança e parceria.

À Dra. Gláucia Salles Cortopassi Buso, Dra. Mirtes Freitas Lima (Embrapa Hortaliças), Carlos Ragassi e Lúcio Flávio pelas orientações, apoio e sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Genética Vegetal (Embrapa Recursos Genéticos) pela cordialidade e constantes dicas na realização dos trabalhos de caracterização molecular.

Aos amigos Murillo Lobo Jr. e Adriana Teramoto que nem imaginam o quanto foram importantes no início dessa jornada.

Ao prof. Dr. Maurício Ballesteiro Pereira, pelo auxílio em análises estatísticas.

Aos estudantes do IF Goiano, em nome dos acadêmicos Renato, Levi, Paulo Jr e Denner, incansáveis guerreiros e auxiliares.

Ao meu irmão Daniel pela hospitalidade, apoio e companheirismo.

À minha querida esposa Danielly pelo apoio incondicional, incentivo e auxílio indispensável nos trabalhos.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, minha gratidão.

RESUMO

MARTINEZ, Aurélio Ludovico de Almeida. **Variabilidade genética e reação a doenças em acessos de *Capsicum baccatum***. 2014. 75p Tese (Doutorado em Fitotecnia) Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2014.

Originárias das Américas e tendo o Brasil como importante centro de diversidade, as pimentas do gênero *Capsicum* ocupam posição de destaque entre as hortaliças. O presente trabalho teve como objetivos: 1) verificar a similaridade genética e a presença de duplicatas; 2) avaliar a resistência à *Colletotrichum* spp.; e 3) avaliar a incidência de viroses em acessos de *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano - Campus Ceres. A similaridade genética foi determinada pela caracterização molecular realizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por meio de marcadores ISSR e RAPD e descritores morfológicos definidos para *Capsicum* spp. De acordo com a caracterização molecular e morfológica pôde-se verificar diversidade genética entre os acessos *C. baccatum* e a inexistência de duplicatas na coleção. A resistência à antracnose foi avaliada aos 50 e 120 dias após a dispersão de pó de pimenta preparado a partir de frutos infectados, considerando incidência (presença e ausência de lesões no fruto) e severidade de doença (percentual de superfície de lesão em relação à superfície total do fruto), a partir do processamento de imagens dos frutos doentes. A avaliação foi realizada em condições de campo, utilizando desenho experimental em blocos completos casualizados aumentados com quinze plantas por parcela e três variedades comerciais como testemunhas. Foi observada diferença significativa entre os tratamentos, especialmente na severidade da doença, nos dois períodos observados. A incidência de viroses foi avaliada em dois experimentos conduzidos em campo, nos períodos entre junho a dezembro 2012 e janeiro a junho de 2013. Foi realizado teste DAS-Elisa, com leitura de absorbância a 405 nm em leitora de placas, em amostras das plantas sintomáticas e quatro plantas assintomáticas em todas as parcelas. Os vírus avaliados foram o tobamovirus *Pepper mild motle virus* (PMMoV), o cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV), o tospovirus *Groundnut ring spot virus* (GRSV), *Tomato spot wilt virus* (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e os potyvirus *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). No período de junho a dezembro de 2012, os vírus detectados e respectivo percentual de incidência foram PMMoV 30%, CMV 6%, PVY 8%, PepYMV 25%, GRSV 10%, TCSV 11%, TSWV 0%. Já no período de janeiro a junho de 2013, o percentual de incidência dos respectivos vírus foram: PMMoV 7%, CMV 27%, PVY 12%, PepYMV 22%, GRSV 2%, TCSV 0% e TSWV 11%. Para todos os vírus estudados, houveram acessos nos quais não foi detectada a presença do vírus, com destaque para IFET 64 (não detectado PMMoV, CMV, PepYMV e PVY), IFET 273, (não detectados PMMoV, PVY, TSWV, TCSV e GRSV, IFET 19 (não detectado CMV, PVY, TSWV, TCSV e GRSV).

Palavras chave: Recursos genéticos. Coleção de germoplasma. Pimenta. Marcadores moleculares.

ABSTRACT

MARTINEZ, Aurélio Ludovico de Almeida. **Genetic variability and disease reaction in *Capsicum baccatum* accessions**. 2014. 75 p. Thesis (PhD in Plant Science) Institute of Agronomy, plant science Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2014.

Originating from Americas, with Brazil as an important center of diversity, *Capsicum* occupies an important position among greenery. This study aimed to 1) to assess the genetic similarity and presence of duplicates; 2) to evaluate the resistance to anthracnose disease 3) screening viruses resistance in *Capsicum baccatum* accessions from Instituto Federal Goiano - *Campus Ceres* genebank. The genetic similarity was determined by molecular characterization at Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia through RAPD and ISSR markers and morphological descriptors defined for *Capsicum* spp. According to the molecular and morphological characterization it was confirm the genetic diversity among *C. baccatum* accessions and the lack of duplicates. The anthracnose resistance was evaluated at 50 and 120 days after the dispersion of pepper powder prepared from infected peppers, considering incidence (presence or absence of lesions in fruits) and disease severity (surface damage percentage to the surface total of fruit) through images processing of diseased fruits. The essay was carried out under field conditions, using augmented randomized complete block design with fifteen plants per plot and three commercial varieties as control. Significant difference was observed especially in disease severity between treatments in both periods observed. The viruses incidence was evaluated in two field experiments in the periods between June-December 2012 and January-June 2013. DAS-ELISA test was performed with absorbance reading at 405 nm on a plate reader, all symptomatic and four asymptomatic plants in all plots was sampled, at 180 days after transplanting in the first experiment, and 160 days after transplanting in second one. The Viruses evaluated were tobamovirus *Pepper mild motle virus* (PMMoV), the cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV), the tospovirus *Groundnut ring spot virus* (GRSV), *Tomato spot wilt virus* (TSWV) and *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and potyvirus *Potato virus Y* (PVY) and *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). The percentage of incidence in the first and second period evaluated, were 30% e 7% PMMoV, 6% e 27% CMV, 8% e 12% PVY, 25% e 22% PepYMV, 10% e 2% GRSV, 11% e 0% TCSV, 0% e 11% TSWV. Virus were not detected several accessions studied and are potential sources of virus resistance that should be confirmed on resistance testing under controlled conditions.

Key words: Genetic resource. Genebank. Pepper. Molecular markers.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variedade botânica, características e origem dos acessos de <i>Capsicum baccatum</i> caracterizados.	10
Tabela 2: Iniciadores ISSR e RAPD selecionados, sequência de nucleotídeos e número de bandas polimórficas apresentadas por cada iniciador na caracterização de <i>Capsicum baccatum</i>	14
Tabela 3: Teste de médias de severidade de antracnose em frutos de acessos de <i>Capsicum baccatum</i> ajustadas, observadas em campo, aos 50 e 120 dias após dispersão (DAD) do inóculo.	33
ANEXO B – Tabela 4: Características morfológicas de acessos de <i>Capsicum baccatum</i> do Banco de Germoplasma do Instituto Federal Goiano – Campus Ceres. (Continua).....	57
ANEXO C – Tabela 5: Interpretação das bandas apresentadas pelos marcadores ISSR em caracterização molecular de <i>Capsicum baccatum</i>	59
ANEXO D – Tabela 6: Interpretação das bandas apresentadas pelos marcadores RAPD em caracterização molecular de <i>Capsicum baccatum</i>	60
ANEXO E – Tabela 7: Representação esquemática dos dados no delineamento em blocos completos casualizados aumentados (adaptado de NOGUEIRA e GOMES, 1978).	61
ANEXO F: Tabela 8: Esquema de análise de variância para o experimento, em blocos completos casualizados aumentados.	62
ANEXO L - Tabela 9: Porcentagem de infecção de viroses em acessos de <i>Capsicum baccatum</i> em duas épocas de semeadura e avaliação, em condições de campo.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mudanças dos acessos de <i>C. baccatum</i> utilizadas para extração de DNA e caracterização molecular.	8
Figura 2: Amostra de folha utilizada para extração de DNA.	9
Figura 3: Análise de agrupamento pelo método UPGMA de 30 genótipos de <i>Capsicum baccatum</i> com base em avaliação morfológica.	13
Figura 6: Similaridade entre genótipos de <i>Capsicum</i> com base em 57 marcadores ISSR e 34 RAPD, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA.	18
Figura 7: Frutos de IFET 121 de três diferentes plantas.	20
Figura 4: Conídios de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> isolados de pimenta dedo-de-moça inoculados com suspensão preparada a partir do pó de pimentas infectadas.	31
Figura 5: Incidência relativa de antracnose em 30 genótipos de <i>Capsicum baccatum</i> 50 dias e 120 dias após dispersão do inóculo.	32
Figura 6: Severidade média de antracnose (<i>Colletotrichum</i> sp.), em frutos de 30 genótipos de <i>Capsicum baccatum</i> , avaliados aos 50 e 120 dias após dispersão do inóculo (DAD) em campo.	32
Figura 8: Percentual de infecção por vírus em acessos de <i>Capsicum baccatum</i> , avaliados em dois períodos de cultivos.	44
Figura 9: Taxa de infecção de Potato virus Y – PVY, <i>Pepper yellow mosaic virus</i> - PepYMV, <i>Cucumber mosaic virus</i> – CMV, <i>Pepper mild mottle virus</i> – PMMoV, <i>Groundnut ring spot virus</i> – GRSV, <i>Tomato chlorotic spot virus</i> – TCSV e <i>Tomato spotted wilt virus</i> - TSWV em acessos de <i>C. baccatum</i> em diferentes épocas. * Transplante 29/6/12; 148 plantas amostradas; ** Transplante 16/1/13; 281 plantas amostradas.	45
Figura 10: Percentual de infecção por <i>Pepper mild mottle virus</i> – PMMoV em dois períodos de avaliação em acessos de <i>Capsicum baccatum</i>	46
Figura 11: Percentual de infecção por <i>Potato virus Y</i> – PVY em dois períodos de avaliação em acessos de <i>Capsicum baccatum</i>	46
Figura 12: Percentual de infecção por <i>Pepper yellow mosaic virus</i> - PepYMV em dois períodos de avaliação em acessos de <i>Capsicum baccatum</i>	47
Figura 13: Percentual de infecção por <i>Cucumber mosaic virus</i> – CMV em dois períodos de avaliação em acessos de <i>Capsicum baccatum</i>	47
Figura 14: Percentual de infecção por Tospovirus no período de junho a dezembro de 2012(A) e janeiro a junho de 2013 (B) em acessos de <i>Capsicum baccatum</i> . GRSV -	

Groundnut ring spot virus; TCSV - *Tomato chlorotic spot virus*; TSWV – *Tomato spotted wilt virus* -49

ANEXO M – Figura 15: Exemplos de acessos de *Capsicum baccatum* estudados.....67

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I.....	3
DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE <i>Capsicum baccatum</i> AVALIADA POR MARCADORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO.....	6
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1 Material Genético	8
2.2 Caracterização Morfológica	8
2.3 Extração de DNA Genômico.....	9
2.4 Reações de amplificação com iniciadores ISSR e RAPD.....	10
2.5 Análise da Diversidade.....	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1 Similaridade com base em descritores morfológicos	12
3.2 Similaridade pela análise molecular	13
4 CONCLUSÕES	21
5 REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II.....	24
AVALIAÇÃO DE ACESSOS DE <i>Capsicum baccatum</i> EM RELAÇÃO À ANTRACNOSE 24	
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Acessos avaliados e implantação do experimento.....	29
2.2 Obtenção e identificação do inóculo	29
2.3 Inoculação em condições de campo	29
2.4 Avaliação da incidência de antracnose em frutos.....	29
2.5 Avaliação da severidade de antracnose em condições de campo.....	29
2.6 Análise estatística dos dados de severidade de antracnose em frutos	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

3.1	Identificação do inóculo	31
3.2	Incidência de Antracnose em frutos, sob condições de campo	31
3.3	Severidade de antracnose em frutos, sob condições de campo	32
4	CONCLUSÕES	35
5	REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO III		38
INCIDÊNCIA DE VIROSES EM ACESSOS DE <i>CAPSICUM BACCATUM</i> , EM CONDIÇÕES DE CAMPO.....		38
RESUMO		39
ABSTRACT		40
1	INTRODUÇÃO.....	41
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1	Amostragem dos acessos	43
2.2	Teste sorológico.....	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4	CONCLUSÕES	50
5	REFERÊNCIAS	51
CONCLUSÕES GERAIS		54

INTRODUÇÃO GERAL

As pimentas do gênero *Capsicum* são originárias das Américas, sendo uma das primeiras culturas domesticadas pelo homem. O Brasil é um importante centro de diversidade deste gênero, com histórico de uso pelos nativos, relatados pelos portugueses quando aqui chegaram. As pimentas são utilizadas especialmente como condimentos, industrializadas ou *in natura*, mas o uso farmacêutico também é considerável, especialmente em tratamentos de dores. Comunidades amazônicas tem a pimenta como um dos principais “remédios” para várias enfermidades.

O cultivo de pimentas é realizado em todos os Estados da Federação, com os mais variados tipos. A produção de pimentas é realizada principalmente em propriedades de economia familiar, por vezes em integração com indústrias alimentícias. Boa parte dos produtores utilizam sementes oriundas de suas lavouras, o que favorece a manutenção da biodiversidade e do fluxo gênico entre agricultores, por outro lado, contribui para as baixas produtividades e uniformidades observadas nos cultivos de pimentas.

Dentre os problemas enfrentados pelos produtores de pimentas, a ocorrência de viroses e de antracnose ocupam posição de destaque. Dentre os vírus, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Potato virus Y* (PVY), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) são os detectados com maior frequência, sendo seu controle unicamente preventivo. A antracnose é causada por várias espécies de *Colletotrichum* especialmente em época chuvosa, causando perdas em campo e pós-colheita.

O melhoramento genético de pimentas *Capsicum* spp. possui o objetivo de selecionar cultivares com características de interesse econômico, produtivas e resistentes às principais doenças que afetam a cultura. Para isso, a coleta e caracterização de germoplasma são tarefa importante nesse processo. Além de também contribuir na manutenção da biodiversidade, ameaçada pela expansão das grandes culturas.

O Estado de Goiás, apesar de apresentar rica diversidade em tipos de pimentas, não possui muitos exemplares em coleções de germoplasma. Assim, com o apoio da Embrapa, foi criada uma coleção de germoplasma que conta hoje com 320 acessos de *Capsicum* spp., coletados principalmente nos municípios do Norte Goiano. Praticamente todos os acessos encontram-se caracterizados morfológicamente e, duas linhagens de pimentas, uma bode e uma cabacinha, foram obtidas através de cinco gerações de autofecundação utilizando-se o método de melhoramento “Single Seed Descent” (SSD) modificado, devendo ser lançadas como cultivares em breve.

A avaliação de germoplasma para doenças permite a identificação de fontes de resistência que poderão ser utilizadas em programas de melhoramento que visam resistência a doenças a outras características de interesse. Comumente, os testes de avaliação de resistência a doenças são realizados sob condições controladas, expondo os acessos a poucas estirpes virais ou isolados de fungos. Entretanto, vários estudos demonstram interações do isolado-genótipo vegetal, levando rapidamente a quebras de resistência, como ocorreu com os genes *Sw-1*, *Sw-2*, *Sw-3* e *Sw-4*, que conferia resistência a tospovírus em tomate. Portanto, a avaliação da reação de genótipos a patógenos em condições de campo é apontada por alguns pesquisadores como um método importante para avaliação de resistência a doenças.

O presente trabalho teve como objetivos efetuar a caracterização morfológica e molecular de acessos de *C. baccatum* da coleção de germoplasma do IF Goiano, realizar prospecção inicial para resistência a viroses e avaliar a reação à *Colletotrichum* spp, em condição de campo.

No Capítulo I foi descrita a caracterização molecular, com marcadores ISSR e RAPD, e morfológica, com base em vinte e dois descritores do Bioversity Internatinal, realizada em 27 acessos de *C. baccatum*. No Capítulo II foi descrita a avaliação da incidência e severidade de antracnose, em condições de campo, nos mesmos acessos. No Capítulo III foi descrita a avaliação da incidência de viroses em condições de campo e infecção natural, nos 27 acessos de *C. baccatum*, avaliados em duas épocas.

CAPÍTULO I
DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Capsicum*
***baccatum* AVALIADA POR MARCADORES MORFOLÓGICOS E**
MOLECULARES

RESUMO

As pimentas do gênero *Capsicum* são originárias das Américas, tendo o Brasil como importante centro de diversidade. Os acessos de pimentas *Capsicum* spp. da coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano – *Campus* Ceres constituem parte dos recursos genéticos de *Capsicum* sp. da região central do Brasil. O conhecimento da variabilidade genética existente e as relações entre os acessos é um pré-requisito para o manejo eficiente de coleções de germoplasma e geram subsídios para programas de melhoramento genético. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar e avaliar a divergência genética entre 27 acessos de *C. baccatum* da coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano – *Campus* Ceres, além de identificar a possível existência de duplicatas, através das caracterizações morfológica e molecular. Foram utilizados 22 descritores morfológicos determinados para *Capsicum*, 10 marcadores ISSR e 7 marcadores RAPD para a caracterização molecular. As distâncias genéticas foram calculadas utilizando-se o índice de similaridade de Jacard e a diversidade genética foi avaliada por meio do método de agrupamento UPGMA, gerando um dendograma para análise molecular e outro para análise morfológica. Na avaliação morfológica os acessos foram agrupados no dendograma segundo os tipos dedo-de-moça, cambuci, pimentas de frutos redondos e triangulares, e cumari. A partir da análise molecular os acessos de *C. baccatum* var. *pendulum* agruparam-se separadamente do acesso IFET 145 (*C. baccatum* var. *praetermissum*). Foi observada diversidade genética entre os acessos de *C. baccatum* var. *pendulum* com a formação de sete subgrupos, mesclando pimentas tipo dedo-de-moça com outros tipos. Dois acessos de pimenta do tipo cambuci agruparam-se com os demais acessos de *C. baccatum* var. *pendulum*. Não foram encontradas duplicatas entre os acessos estudados. A caracterização molecular permitiu avaliar a similaridade genética entre os acessos com maior precisão que a caracterização morfológica.

Palavras chave: Pimenta. Coleção de germoplasma. Recursos genéticos. Biodiversidade

ABSTRACT

Capsicum peppers are native from the Americas, with Brazil being a significant diversity center. *Capsicum* sp. accessions at the Federal Institute of Goias (Instituto Federal Goiano) – Ceres Campus represent a portion of the *Capsicum* sp. genetic resources from the central region of Brazil. Knowledge of the variability and relationships among genotypes is necessary for the efficient management of germplasm collections and provides support for genetic improvement programs. The aim of the present study was to evaluate and characterize the genetic diversity among 27 *C. baccatum* L. accessions by means of morphological and molecular characterizations. Twenty-two morphological descriptors, 57 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and 34 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers were used. The genetic distance was calculated by means of the Jaccard similarity index, and the genetic diversity was assessed by means of cluster analysis using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), resulting in two dendrograms, one for morphological analysis and the other for molecular analysis. For the morphological analysis, the accessions clustered according to fruit type as elongated, cambuci, round-shaped, triangular-shaped and cumari peppers; these criteria were not sufficient to distinguish between IFET and BRS Mari cultivars. For the molecular analysis, *C. baccatum* var. *pendulum* accessions clustered separately from accession IFET 145 (*C. baccatum* var. *praetermissum*). Genetic diversity was found among *C. baccatum* var. *pendulum* accessions, resulting in the establishment of seven subgroups in which girl's finger peppers were mixed with other types. The two cambuci types clustered together with the remainder of the *C. baccatum* var. *pendulum* accessions. The results allow inferring that most *C. baccatum* accessions corresponded to the variety *pendulum* and that there were no duplicates among the analyzed accessions; morphological analysis did not allow distinguishing between IFET 68 and BRS Mari, and molecular characterization allowed for more precise assessments of the genetic similarity among the accessions compared to morphological characterization.

Key words: **Keywords:** Pepper. Germplasm bank. Genetic resources. Biodiversity. ISSR. RAPD

2 INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* (do grego *Kapso* - arder, picar) compreende as pimentas e pimentões, não possuindo parentesco com pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L., Piperaceae), pimenta-rosa (*Schinus molle* L., Anacardiaceae) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl, Myrtaceae) (CARVALHO et al., 2006, CARVALHO e BIANCHETTI, 2008). As pimentas do gênero *Capsicum* são oriundas do continente americano (BUSO et al., 2001), com evidências arqueológicas de seu cultivo entre 5.200 e 3.400 a.C. no Peru e na Bolívia, comprovando ser uma das plantas cultivadas mais antigas das Américas (RUFINO e PENTEADO, 2006; PERRY et al., 2007). Powis et al. (2013), utilizando UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), encontraram resíduos de pimenta em vasos Maias de sítios arqueológicos em Chiapas, México, supostamente para ajudar na conservação de sementes de milho. No Brasil, relatos de exploradores do período colonial demonstram que as pimentas eram amplamente utilizadas na dieta dos nativos, inclusive como armas pelos índios caetés (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2008). Do Brasil, as pimentas foram dispersas a outros continentes pelos navegadores portugueses entre os anos 1492 e 1600 (REIFSCHNEIDER et al., 2009).

O Brasil é um centro de diversidade secundário do gênero *Capsicum* (SUDRÉ et al., 2010), sendo encontrados cerca de 35 táxons (espécies e suas variedades), classificados de acordo com o nível de domesticação (BIANCHETTI e CARVALHO, 2005). Das espécies domesticadas *C. annuum* var. *annuum* L., *C. baccatum* var. *pendulum* (Wild.) Eshbaugh, *C. chinense* Jacquin, *C. frutescens* L. e *C. pubescens* Ruiz & Pavon, somente a última não é encontrada no Brasil (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

A região central do Brasil possui riquíssima diversidade do gênero *Capsicum*, entretanto, ameaçada pela expansão agrícola. Pequenas áreas, antes ocupadas por agricultura de subsistência passaram a ser arrendadas para o plantio de cana-de-açúcar. Neste contexto, as coleções e bancos de germoplasma tornam-se importantes mecanismos de conservação *ex situ* (ONUYAMA et al. 2011) dessa diversidade em risco de extinção.

As atividades de coleta, caracterização, multiplicação, documentação e conservação de recursos genéticos possuem grande importância para otimizar o uso desses recursos em programas de melhoramento. É fundamental realizar a coleta e a conservação adequada desse germoplasma e mantê-lo em coleções organizadas, procedendo-se a sua caracterização, avaliação e documentação (CABRAL et al., 2010). Várias expedições de coleta de *Capsicum* foram realizadas pela Embrapa, resultando na criação do maior banco de germoplasma de *Capsicum* do Brasil. Entretanto, poucos acessos foram coletados no meio-norte do estado de Goiás (ONUYAMA et al. 2011).

Para preencher essa lacuna, o Instituto Federal Goiano, (IF Goiano) *Campus Ceres*, juntamente com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), através da Embrapa Hortaliças, executou em 2009 atividades de coleta e caracterização de pimentas do gênero *Capsicum*, resultando na criação de uma coleção de germoplasma com significativa variabilidade genética. Entre os meses de março a novembro de 2009, os alunos do IF Goiano foram incumbidos de realizar a coleta de frutos em suas cidades de origem. Foram coletados 315 materiais, abrangendo 49 municípios dos Estados de Goiás, Tocantins e Mato Grosso. Os genótipos coletados foram caracterizados e separados por espécie, sendo 4,1% dos acessos identificados como *C. annuum*, 14,4% como *C. baccatum*, 50% como *C. chinense*, 14,2% como *C. frutescens* e 17,2% não identificada a espécie (*Capsicum* spp.) (ONUYAMA et al. 2011).

A espécie *C. baccatum* caracteriza-se pelas manchas difusas amareladas ou esverdeadas na base de cada lóbulo da corola (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008). Evidências apontam que a espécie tenha sido domesticada em vários locais simultaneamente, porém com ancestrais

na Bolívia e Peru. Apesar da aparente não contribuição genética das variedades silvestres brasileiras na domesticação dessa espécie, os genótipos domesticados e silvestres brasileiros podem ajudar a elucidar a origem e domesticação dessa espécie (ALBRECHT et al., 2012)

C. baccatum está dividida em três variedades botânicas, *pendulum*, *baccatum*, *praetermissum* (ALBRECHT et al., 2012; CARVALHO e BIANCHETTI, 2008). A variedade *pendulum* (Wild.) é representada pelas pimentas dedo-de-moça e chapéu-de-frade ou cambuci, sendo encontradas no noroeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, sul e sudeste do Brasil. A variedade *baccatum*, espécie semidomesticada, conhecida como cumari-verdadeira ou pimenta-de-passarinho, é encontrada na parte central do Peru, na Bolívia, no norte da Argentina e no sul e sudeste do Brasil. A variedade *praetermissum*, semidomesticada, também chamada de cumari-verdadeira ou pimenta-de-passarinho, ocorre unicamente no Brasil, principalmente na Região Centro-Oeste e Sudeste (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

O conhecimento da variabilidade genética e as relações entre os acessos é um pré-requisito para o manejo eficiente de coleções de germoplasma (ALBRECHT et al., 2012), além de gerar subsídios para o melhoramento genético (BUSO et al., 2001; MOURA et al., 2013). A caracterização morfológica permite descrever, identificar e diferenciar os acessos de uma mesma espécie, fornecendo estimativas de variabilidade dentro da coleção de germoplasma (BURLE e OLIVEIRA, 2010). Para o gênero *Capsicum*, são utilizados descritores pré-definidos (IPGRI, 1995) e outros descritores que o pesquisador julgar interessante para caracterizar os acessos. A caracterização molecular revela o polimorfismo nas sequências de DNA entre diferentes indivíduos, permitindo a estimativa de diversidade genética, identificação de clones, híbridos, taxa de cruzamento, parentesco, mapa genético (AZEVEDO, 2010). Além disso, a identificação e eliminação de duplicatas pode reduzir custo e trabalho de conservação de germoplasma (RODRIGUES et al., 1999).

Na caracterização molecular podem ser utilizados diferentes marcadores, conforme o objetivo e disponibilidade de recursos. Os principais marcadores utilizados são: *Restriction Fragment Length Polymorphis* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* AFLP), *Randon Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) e *Simple Sequence Repeats* (SSR) (AZEVEDO, 2010).

A caracterização via marcadores ISSR possui custo relativamente baixo, proporciona alta reprodutibilidade e apresenta elevado número de fragmentos polimórficos. Os marcadores ISSR são dominantes e o produto da amplificação não é conhecido, ou seja, são marcadores aleatórios assim como os RAPDs. Entretanto, por possuírem maior superfície de ancoragem dos iniciadores, os marcadores ISSR são mais confiáveis, proporcionando maior especificidade (BORNET e BRANCHARD, 2001).

Os marcadores RAPD e ISSR podem ser usados na ausência de conhecimento da sequência de nucleotídeos do DNA da espécie, detectando polimorfismos que funcionam como marcadores genéticos e podem ser usados para análises de variabilidade e construção de mapas genéticos, dentre outros estudos (ARIF et al., 2010). A técnica é simples, rápida, possui baixo custo e exige pequena quantidade de DNA na reação. Porém, no caso de RAPD, há dificuldade em reproduzir os resultados com mudança de condições, pessoas ou laboratório (KARP et al., 1997).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética dos acessos de *C. baccatum* da Coleção de Germoplasma do Instituto Federal Goiano - *Campus* Ceres, e identificar possíveis duplicatas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Genético

Foram utilizados 27 acessos de *C. baccatum* da Coleção de Germoplasma do IF Goiano - Campus Ceres (Tabela 1) e três genótipos comerciais como testemunha, 'BRS Mari', Dedo-de-moça comercial e Cambuci comercial.

Para a caracterização morfológica, 15 plantas de cada um dos 30 genótipos foram cultivadas em campo no delineamento blocos aumentados, com espaçamento de 1 m x 0,8 m. Para extração de DNA (análise molecular), foi realizada semeadura em copos descartáveis de 300 ml, sendo o DNA extraído de uma única planta. Além dos 30 genótipos mencionados, foram utilizados na análise molecular DNA dos acessos CNPH 3773 (*C. chinense*) e CNPH 4266 (*C. frutescens*) como *outgroups* propositais para evidenciar o agrupamento dos acessos de *C. baccatum* e ilustrar a referência dessas duas outras espécies.



Figura 1: Mudanças dos acessos de *C. baccatum* utilizadas para extração de DNA e caracterização molecular.

3.2 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica dos acessos foi realizada considerando-se descritores recomendados para *Capsicum* (IPGRI, 1995). Os descritores utilizados foram: número de flores por axila, posição da flor, cor da corola, cor da mancha da corola, estigma, cor do fruto maduro, formato do fruto, comprimento do fruto, largura do fruto, espessura do pericarpo, formato do fruto na conexão com o pedicelo, formato do ápice do fruto, apêndice no ápice do fruto, corrugação da seção transversal do fruto, número de lóculos, persistência do pedicelo no fruto, hábito de crescimento e presença de constrição anelar do cálice. Além de posição do fruto (pendente, ereto e intermediário), aroma (baixo, médio e alto) e pungência (picante alto, picante médio, picante baixo, sem picância e não definido).

As características quantitativas foram transformadas em informações binárias e avaliadas como qualitativas. Comprimento do fruto foi dividido em seis classes: 1 (até 20 mm), 2 (21 a 40 mm), 3 (41 a 60 cm), 4 (61 a 80 mm), 5 (81 a 100 mm) e 6 (>100 mm). A largura do fruto foi dividida em seis classes: 1 (até 8 mm), 2 (9 a 16 mm), 3 (17 a 24 mm), 4 (25 a 32 mm), 5 (33 a 40 mm) e 6 (41 a 48 mm). A espessura do pericarpo foi dividida em quatro classes: 1 (0,5 mm), 2 (1,1 a 1,5 mm), 3 (1,6 a 2,0 mm) e 4 (> 2,1 mm). A massa média de 10 frutos foi dividida em quatro classes: 1 (até 4 g), 2 (5 a 8 g), 3 (9 a 12 g) e 4 (> 13 g).

3.3 Extração de DNA Genômico

A extração de DNA foi realizada a partir de amostra de folha com aproximadamente 1 cm coletada de uma única planta (Figura 2). As amostras foram colocadas em tubos de microcentrífuga (Eppendorf) de 1,5 ml juntamente com esferas de cerâmica para maceração (“beads”). Adicionou-se à amostra 700 μL de tampão de extração (CTAB 2x mais 2 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de β -mercaptoetanol) e macerou-se em triturador *Fast Reip* por 20 segundos. Em seguida, as amostras foram deixadas em banho-maria por 45 minutos, homogeneizando-se suavemente a cada 5 min. Após esfriar por cinco minutos, foram adicionados aos tubos 600 μL de mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, agitando-se suavemente. As amostras foram centrifugadas a 1200 RPM por 10 minutos. Aproximadamente 400 μL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo Eppendorf de 1,5 mL. Adicionou-se 400 μL de isopropanol, agitou-se suavemente e, em seguida, deixou-se em freezer por uma hora. Após o repouso, as amostras foram centrifugadas a 8000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% e, depois, com o mesmo volume de etanol 100%. Em seguida, o precipitado foi seco em liofilizador modelo “Speed Vac” por quinze minutos. As amostras foram ressuspensas com 55 μL de TE (Tris EDTA pH 8,0) acrescido de 2 $\mu\text{L ml}^{-1}$ RNase e deixado em ambiente por 20 horas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Após extração, foi quantificada a concentração de DNA em gel de agarose 1% para efetuar a diluição para concentração de trabalho, entre 1,5 a 3 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$.



Figura 2: Amostra de folha utilizada para extração de DNA.

Tabela 1. Variedade botânica, características e origem dos acessos de *Capsicum baccatum* caracterizados.

Acesso	Variedade botânica	Tipo	Forma do fruto	Cor do fruto maduro ¹	Pungência ²	Município de coleta	UF
IFET 19	<i>pendulum</i>	nd	triangular	VE	1	Ceres	GO
IFET 64	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	1	Itaguari	GO
IFET 68	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	V	1	Itaguari	GO
IFET 85	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	V	1	Ceres	GO
IFET 103	<i>pendulum</i>	nd	triangular	VC	1	Rubiataba	GO
IFET 110	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	V	1	Mozarlândia	GO
IFET 111	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	V	1	Goiás	GO
IFET 115	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	1	Uruana	GO
IFET 120	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	1	Cocalinho	MT
IFET 121	<i>pendulum</i>	nd	triangular	VE	3	Rubiataba	GO
IFET 124	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	V	nd	Ipiranga de Goiás	GO
IFET 137	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	A	1	Pirenópolis	GO
IFET 145	<i>praetermissum</i>	Cumari	redondo	VE	1	Heitorai	GO
IFET 186	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	1	Palmeirópolis	GO
IFET 202	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	2	Hidrolina	GO
IFET 207	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	3	Ceres	GO
IFET 210	<i>pendulum</i>	nd	triangular	V	1	Ceres	GO
IFET 224	<i>pendulum</i>		alongado	VC	3	Itapuranga	GO
IFET 235	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	1	Urutai	GO
IFET 241	<i>pendulum</i>	nd	triangular	V	2	Goiânia	GO
IFET 245	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	3	Mara Rosa	GO
IFET 252	<i>pendulum</i>	nd	alongado	V	1	Santa Isabel	GO
IFET 265	<i>pendulum</i>	nd	triangular	V	2		
IFET 273	<i>pendulum</i>	nd	triangular	V	1	Uruana	GO
IFET 289	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	VE	1	Ceres	GO
IFET 291	<i>pendulum</i>	nd	triangular	V	1	Ceres	GO
IFET 292	<i>pendulum</i>	Cambuci	campanular	V	4	Ceres	GO
BRS Mari	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	V	1	Ceres	GO
Cambuci	<i>pendulum</i>	Cambuci	campanular	VC	4	Itaguari	GO
Dedo-de-Moça	<i>pendulum</i>	Dedo-de-moça	alongado	V	1	Itaguari	GO

¹Cor do fruto maduro: VE - vermelho escuro, V - vermelho e VC - vermelho claro, A - alaranjado.

² 1: picante alto, 2: picante médio, 3: picante baixo, 4: doce (sem picância); teste subjetivo analisado por provadores.

nd: não definido.

3.4 Reações de amplificação com iniciadores ISSR e RAPD

Para caracterização molecular foram testados os iniciadores *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) i3 Zm, i4 Zm, i5 Zm, i6 Zm, i7 Zm, i9 Zm, i10 Zm, i11 Zm, i12 Zm, i15 Zm, i16 Zm, i17 Zm, i18 Zm, i19 Zm, i21 Zm, i 23 Zm, i25 Zm, i26 Zm, i27 Zm, i29 Zm, i30 Zm, i31 Zm, i32 Zm, i35 Zm, i36Zm, i38 Zm, i39 Zm, i 42 Zm, i52 Zm, i53 Zm, i54 Zm, i55 Zm, i 56 Zm, i 57 Zm, i 58 Zm, i 59 Zm, i60 Zm, i1 Pv, i 3Pv, i4 Pv, i6 Pv, i7 Ps, i8 Ps, i9 Ps, i10 Ps,

i11 Ps, i12 Ps e os iniciadores *Random Amplified Polimorphic DNA* (RAPD - Operon Technologies, USA) OPA-1, OPA-11, OPA-18, OPAB-08, OPAB-9, OPAB-11, APAB-15, OPAB-16, OPAB-17 OPF-13, OPG-4, OPG-19, OPN-7, OPO-4, OPO-7, OPO-11, OPO-18, OPR-1, OPR-10, OPR-14, POT-4, OPT-5 e OPV-14 . Os iniciadores foram selecionados com base em resultados de outros trabalhos de caracterização molecular em *Capsicum* sp, realizados no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen).

As reações de amplificação de fragmentos de DNA com iniciadores ISSR foram realizadas com volume total da reação de 13 µl, contendo 2,59 µl de água Milli-Q, 10% (v/v) de tampão de reação (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,25 mM de cada dNTP, 1,3 µl 2,5 mg ml⁻¹ albumina sérica bovina, 1,3 U *Taq*-DNA polimerase, 0,25 µl 50 mM MgCl₂, 0,3 mM de iniciador e 9 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em um termociclador com programa de amplificação de 5 minutos a 94° C, 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 56° C e 1 minuto a 72° C e, ao final do último ciclo, 10 minutos a 72°C para extensão final.

As reações de amplificação de fragmentos de DNA com iniciadores RAPD foram realizadas com volume total da reação de 13 µl, contendo 4,67 µl de água Milli-Q, 10% (v/v) de tampão de reação (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada dNTP, 1,04 µl 2,5 mg ml⁻¹ albumina sérica bovina, 1 U *Taq*-DNA polimerase, 0,25 µl 50 mM MgCl₂, 0,14 mM de iniciador e 9 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador, programado para 92° C por 5 minutos, 40 ciclos de 1 minuto a 92° C, 1 minuto a 35° C e 2 minutos a 72° C e, ao final do último ciclo, extensão final a 72° C por 10 minutos.

O produto das reações de PCR foi separado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, acrescido de brometo de etídeo (0,2 µg/mL), em diferença de potencial de 160V, por 90 minutos. Os géis foram documentados por captura de imagem sob o efeito de luz ultravioleta.

Os produtos das reações de PCR foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em solução de corrida TBE, acrescido de brometo de etídeo (0,8 mg ml⁻¹), em diferença de potencial de 160V, por 90 minutos. Para facilitar a corrida, os géis foram cortados antes de serem colocados na cuba. Foram utilizados os marcadores 1 kb ou 1 kb Plus. Os géis foram documentados por captura de imagem sob luz ultravioleta.

3.5 Análise da Diversidade

Cada classe estabelecida para um determinado intervalo de valores para as características morfológicas quantitativas foi tratada como uma característica independente. Pungência, por exemplo, foi caracterizada com base em notas de 1 a 4. Para a geração da matriz de similaridade, foram consideradas 4 categorias (genótipos com nota 1, genótipos com nota 2, genótipos com nota 3 e genótipos com nota 4). Genótipos que se encaixaram em uma mesma categoria (ex. nota 2 de pungência) receberam 1 (presença) para a característica “pungência nota 2” e zero (ausência) para as outras 3. Para a caracterização molecular, cada *amplicon* polimórfico foi considerado uma característica independente e, da mesma maneira, presença de um determinado *amplicon* foi marcada com 1, e ausência, zero. A matriz de similaridade genética entre os genótipos foi calculada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard a partir da planilha binária e os genótipos foram agrupados com base em sua similaridade pelo método UPGMA utilizando-se o programa NTSYS, versão 2.1 (ROHLF, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Similaridade com base em descritores morfológicos

O valor de similaridade entre acessos considerando-se os descritores morfológicos variou de 18% a 100% (Figura 3). Quatro grupos foram visualmente estabelecidos no dendograma, com linha de corte entre eles correspondendo a 35% de similaridade. O agrupamento formado correspondeu à distinção entre os diferentes tipos morfológicos existentes em *C. baccatum* e, dentre os quatro grupos formados, três (I, II e III) foram constituídos unicamente por *C. baccatum* var. *pendulum*. Genótipos apresentando frutos redondos ou triangulares formaram o grupo I, distinto do grupo II, que foi constituído predominantemente por genótipos com frutos alongados, à exceção do acesso IFET 210. O tipo morfológico cambuci, representado no presente estudo por dois genótipos (IFET 292 e Cambuci) formou um grupo isolado. IFET 145, tipo morfológico denominado cumari e único representante de *C. baccatum* var. *praetermissum*, constituiu o agrupamento mais dissimilar ao conjunto de genótipos avaliados.

A formação de grupos de acordo com o tipo morfológico era esperada, uma vez que os tipos morfológicos popularmente conhecidos foram estabelecidos com base nas características dos frutos. Os descritores referentes ao fruto corresponderam a 73% do total de descritores morfológicos utilizados na construção desse dendograma.

Variabilidade entre os genótipos também pode ser observada dentro dos quatro grupos formados. O grupo II foi constituído predominantemente pelo tipo morfológico dedo-de-moça. Foram agrupados também neste grupo acessos que não são do tipo “dedo-de-moça”, como IFET 210, que possui frutos triangulares, IFET 224, uma pimenta vermelha comprida do tipo morfológico conhecido popularmente como chifre-de-veado e IFET 252, que possui frutos alongados e eretos, semelhantes à malagueta (*C. frutescens*), embora com maior comprimento e largura. Os descritores morfológicos utilizados não permitiram distinguir IFET 68 de ‘BRS Mari’. ‘BRS Mari’ é uma pimenta do tipo dedo-de-moça comercial, lançada em 2009, selecionada a partir de uma população introduzida no banco de germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças a partir de coleta realizada em Brasília, Distrito Federal, no ano de 1980 (Carvalho et al, 2009), enquanto IFET 68 foi coletada em Itaguari-GO, no ano de 2009, aparentemente sem relação de origem.

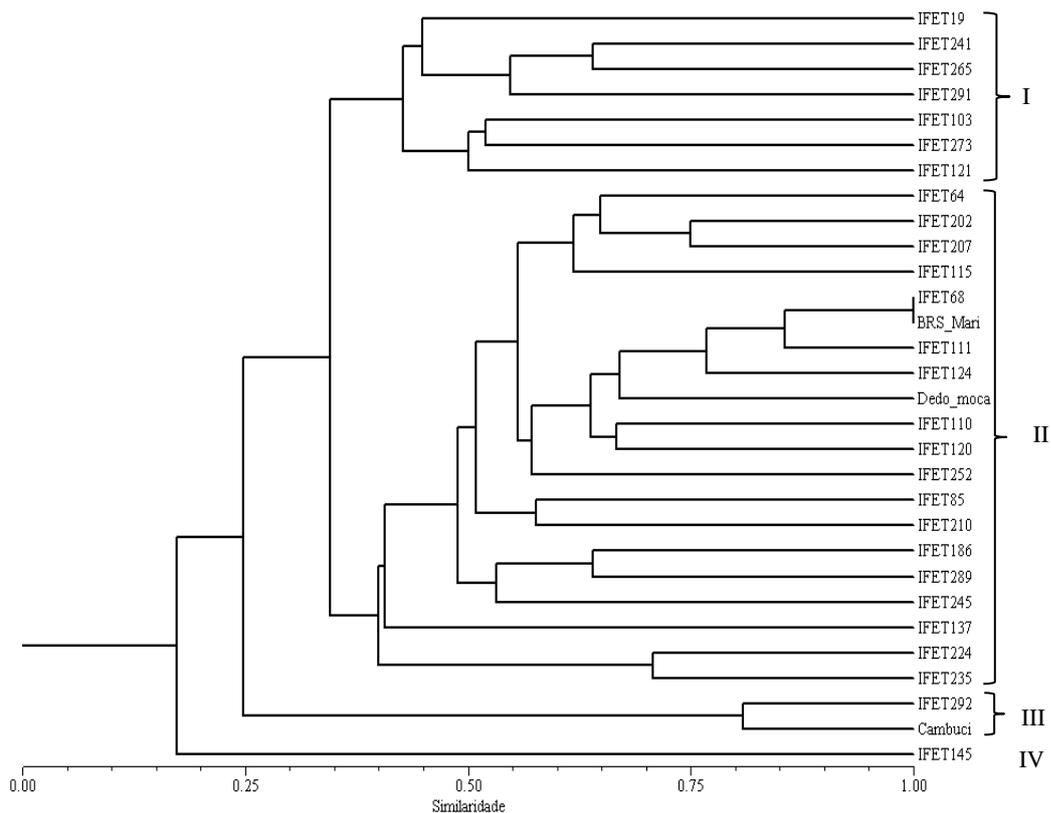


Figura 3: Análise de agrupamento pelo método UPGMA de 30 genótipos de *Capsicum baccatum* com base em avaliação morfológica.

No grupo III, correspondente ao tipo morfológico cambuci, os dois genótipos se diferenciaram quanto ao estigma (IFET 292, estigma excerto, e Cambuci comercial, estigma no mesmo nível das anteras) e quanto à cor do fruto maduro (IFET 292 apresenta fruto maduro com vermelho mais escuro que a testemunha Cambuci).

4.2 Similaridade pela análise molecular

Dos 47 iniciadores ISSR testados, 10 (21,3%) amplificaram 57 bandas polimórficas em reação de PCR. Dos 24 iniciadores RAPD testados, 7 (29,2%) produziram 34 bandas polimórficas (Tabela 2). Entre os iniciadores ISSR, i12 Zm, i18 Zm e i29 Zm produziram o maior número de bandas polimórficas, respondendo por quase 58% das bandas polimórficas obtidas com esse tipo de marcador (Figura 4).

Tabela 2: Iniciadores ISSR e RAPD selecionados, sequência de nucleotídeos e número de bandas polimórficas apresentadas por cada iniciador na caracterização de *Capsicum baccatum*.

Pimer	Sequência	Segmentos de DNA amplificados (pares de base)
ISSR		
i5 Zm	CACACACACACACACAGC	800; 830; 850; 1300; 200
i12 Zm	GGTCAACACACACACAC	1000; 1600; 1650
i18 Zm	GTGCTCTCTCTCTCTC	600; 700; 850; 900; 950; 1000; 1200; 1450; 1600; 1630; 1700; 1950; 2050
i29 Zm	GTGTGTGTGTGTGTC	400; 500; 580; 600; 700; 750; 870
i32 Zm	AGCAGCAGCAGC	780; 800; 850; 880; 985; 1000; 1050; 1070; 1400; 1600; 1650; 1750
i38 Zm	AGCAGCAGCAGCAT	400; 470; 500; 650; 850
i39 Zm	AGCAGCAGCAGCAC	640
i1 Pv	GACAGACAGACARG	280; 320; 670; 750; 840
i4 Pv	YRGACAGACAGACA	320; 400
i7 Ps	AGAGAGAGAGAGAGAGYG	350; 400; 450; 500
Total bandas polimórficas		57
RAPD		
OPF-13	GGCTGCAGAA	750; 800; 850
OPN-7	CAGCCCAGAG	520; 800; 900; 1200; 1300
OPO-7	CAGCACTGAC	250; 300; 450; 520; 600; 850
OPR -1	TGCGGGTCCT	370; 600; 750; 800; 1000; 1100; 1600
OPR-10	CCATTCCCCA	500; 600; 950; 1000
OPR-14	CAGGATCCCC	300; 400; 530; 800; 850
OPT-5	GGGTTTGCA	480; 600; 800; 1500
Total de bandas polimórficas		34

A similaridade genética entre os genótipos variou de 15% a 93%. O dendograma gerado a partir de 57 marcadores ISSR mais 34 marcadores RAPD apresentou quatro grupos considerando-se o corte entre os pontos correspondentes a 35% e 65% de similaridade (Figura 2). Os grupos III e IV foram compostos pelos genótipos inseridos na análise como referências de outras espécies de *Capsicum*, *C. chinense* (Am_669) e *C. frutescens* (Am_342), respectivamente. O grupo II foi formado pelo único representante de *C. baccatum* var. *praetermissum* (IFET 145) avaliado. Os demais genótipos, todos eles pertencentes à espécie *C. baccatum* var. *pendulum*, formaram o grupo I.

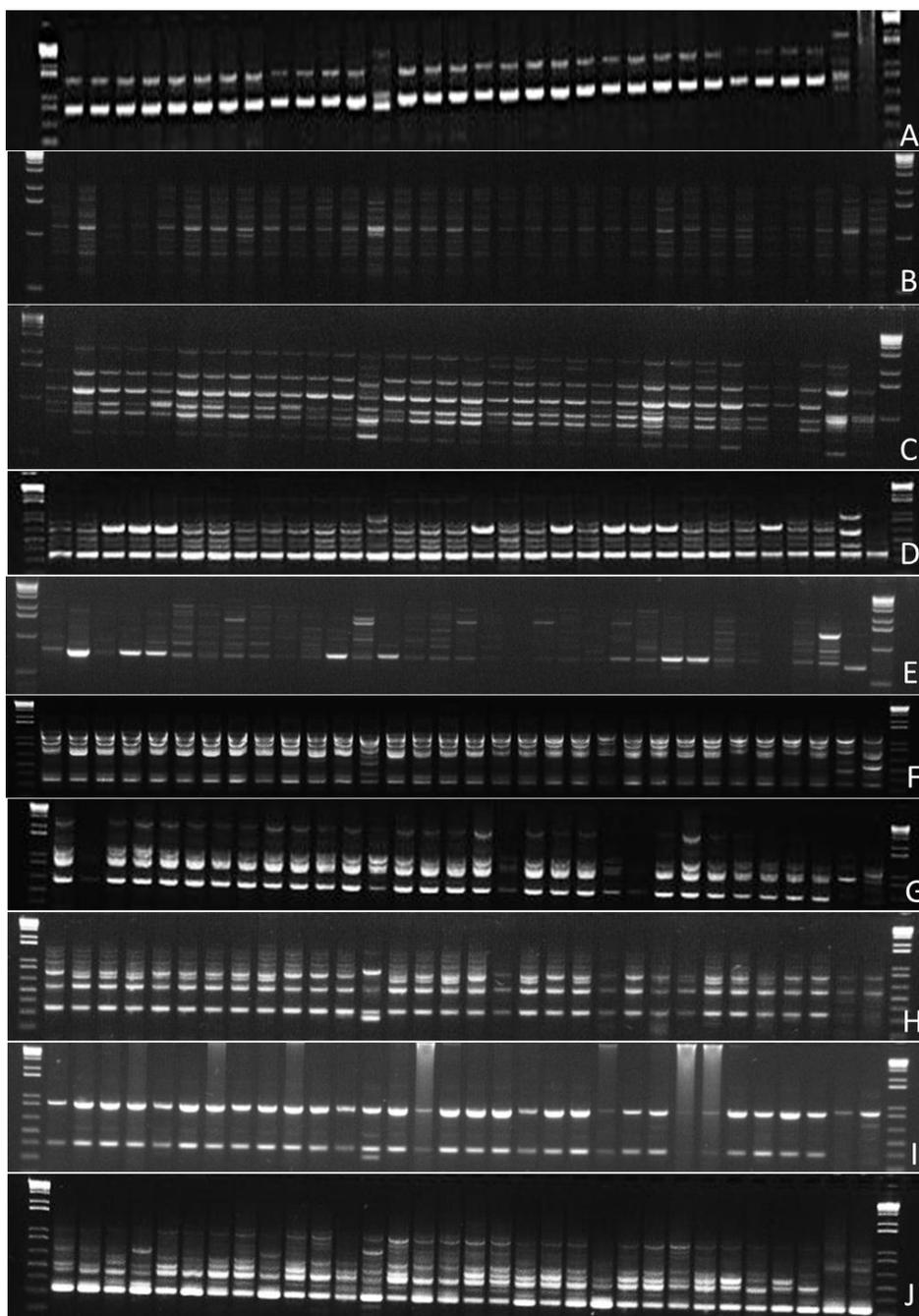
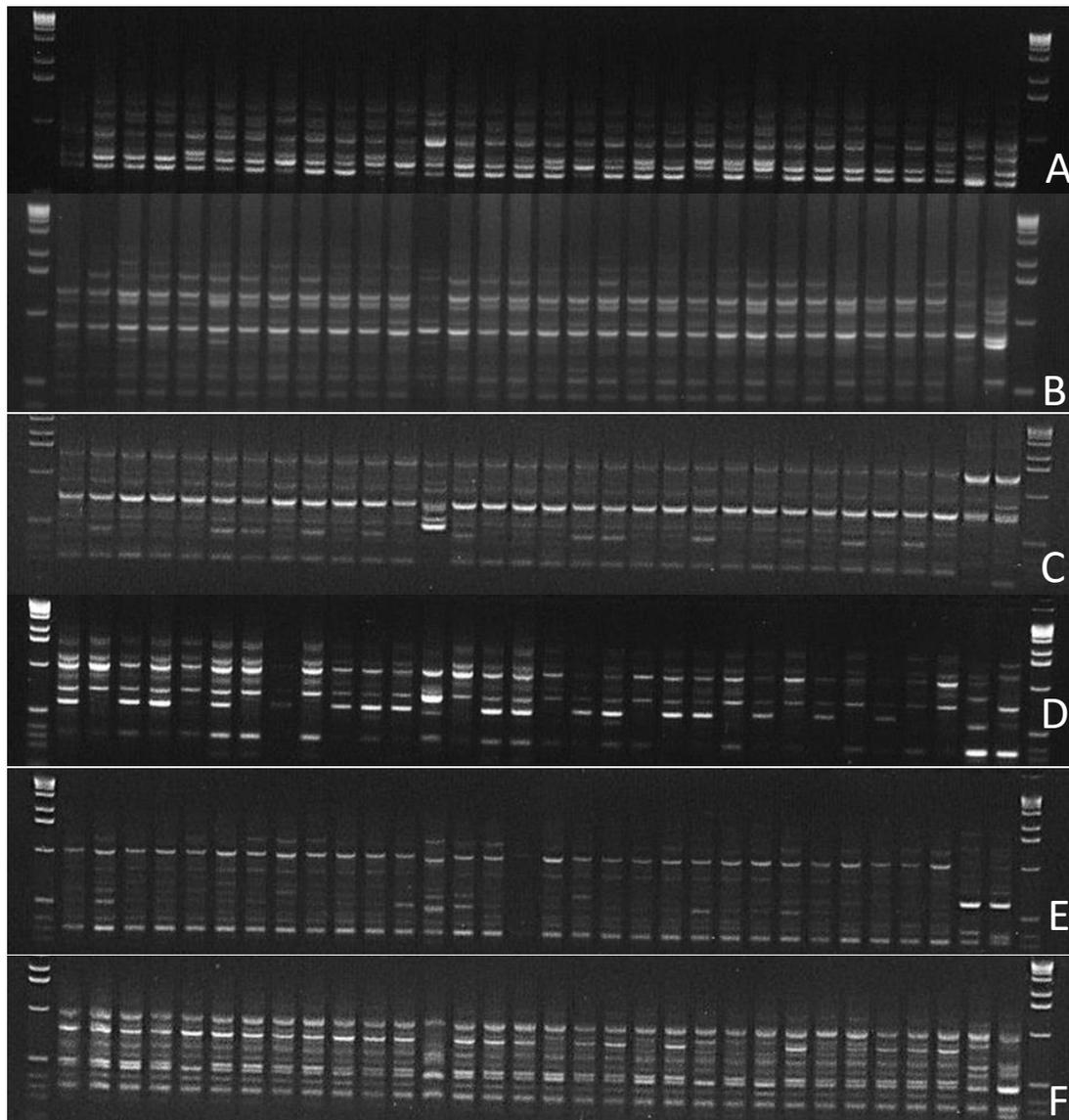


Figura 4: Fragmentos de DNA amplificados por iniciadores ISSR em genótipos de *C. baccatum*, da esquerda para direita, acessos IFET 19, 64, 68, 85, 103, 110, 111, 115, 120, 121, 124, 137, 145, 186, 202, 207, 210, 224, 235, 241, 245, 252, 265, 273, 289, 291, 292, 'BRS Mari', cambuci comercial, dedo-de-moça comercial, CNPH 4266 (*C. frutescens*), CNPH 3773 (*C. chinense*). Iniciadores ISSR: A) i5 Zm; B) i12 Zm; C) i18 Zm; D) i29 Zm; E) i32 Zm; F) i38 Zm; G) i39 Zm; H) i1 Ps; I) i4 Ps; J) i7 Ps.



F. esquerda
pa
2:
G
esquerda
210, 224,
Gal, CNPH
4266 (*C. frutescens*), CNPH 3773 (*C. chinense*). Iniciadores RAPD: A) OPF-13, B) OPN-7, C) OPO-7, D) OPR-1, E) OPR-10, F) OPR-14, G) OPT-55.

Considerando-se essa segunda marca (subgrupos), a cultivar BRS Mari não foi agrupada com os demais acessos, nem mesmo com IFET 68, genótipo morfológicamente similar (Figura 3). Assim como na avaliação morfológica, IFET 292 (tipo morfológico cambuci) agrupou-se com o genótipo comercial Cambuci. O acesso IFET 289, uma pimenta tipo dedo-de-moça, agrupou-se com os genótipos do tipo Cambuci, permanecendo relativamente mais distante dos demais acessos desse mesmo tipo morfológico. Os demais subgrupos formados com diferentes tipos de pimenta evidenciam a diversidade genética entre os acessos de *C. baccatum* var. *pendulum* da coleção, assim como o potencial de geração de heterose em cruzamentos direcionados.

No subgrupo em cujas extremidades encontram-se os acessos IFET 210 e IFET 252, os frutos possuem formato triangular, com exceção de IFET 252, que possui formato alongado. Alta similaridade foi observada entre os genótipos IFET 210 e IFET 241, com diferença em apenas três bandas no iniciador i32 Zm.

O subgrupo entre IFET 121 e IFET 291 englobou genótipos do tipo morfológico dedo-de-moça, uma planta com frutos triangulares (IFET 291), além de uma planta cujos frutos são do tipo morfológico “chifre-de-veado” (IFET 224). Os acessos IFET 121 e IFET 124 apresentaram alta similaridade entre si, se diferenciando em relação aos iniciadores i12 Zm, i18 Zm, i7 Ps e OPO-7, em uma banda cada um. Contudo, IFET 121 apresentou variabilidade entre plantas quanto ao formato de frutos (alongado e triangular, Figura 3), possivelmente devido à segregação genética. Embora os genótipos estudados tenham sido provenientes de autofecundação (1 geração), as sementes dos acessos que compõem o banco de germoplasma advieram de cruzamentos não controlados e, por isso, podem ter sido geradas a partir de fecundação cruzada. Apesar da predominância de autofecundação em *Capsicum*, taxas de fecundação cruzada de 2% a 90% em campo foram observadas (Pickersgill, 1997), dependendo de condições ambientais e da distância física entre as plantas. Além de cruzamentos naturais dentro de uma mesma espécie, pode ocorrer fluxo gênico entre espécies (Carvalho et al. 2006), tendo sido utilizado para transferência de genes de resistência, como, por exemplo, ao Tobacco Mosaic Virus, de *C. chinense* e *C. chacoense* para *C. annuum* (Pickersgill, 1997).

Ainda no subgrupo entre IFET 121 e IFET 291, os genótipos IFET 235 e IFET 245, com alta similaridade, se diferenciaram em relação a uma banda em i18 Zm, i7 Ps, OPO-7 e OPF-13.

O subgrupo entre IFET 64 e Dedo-de-moça comercial foi composto por genótipos do tipo morfológico dedo-de-moça, exceto por IFET 103, que possui frutos arredondados. Neste grupo, IFET 111 e IFET 120 se diferenciaram em relação a uma banda no iniciador i29 Zm e duas bandas no iniciador i7 Ps. Da mesma forma, IFET 202 e IFET 207 se diferenciaram em três bandas no iniciador i32 Zm e uma banda no iniciador OPR-1. Por último, menciona-se o subgrupo formado por IFET 19 (frutos triangulares) e IFET 85 (dedo-de-moça).

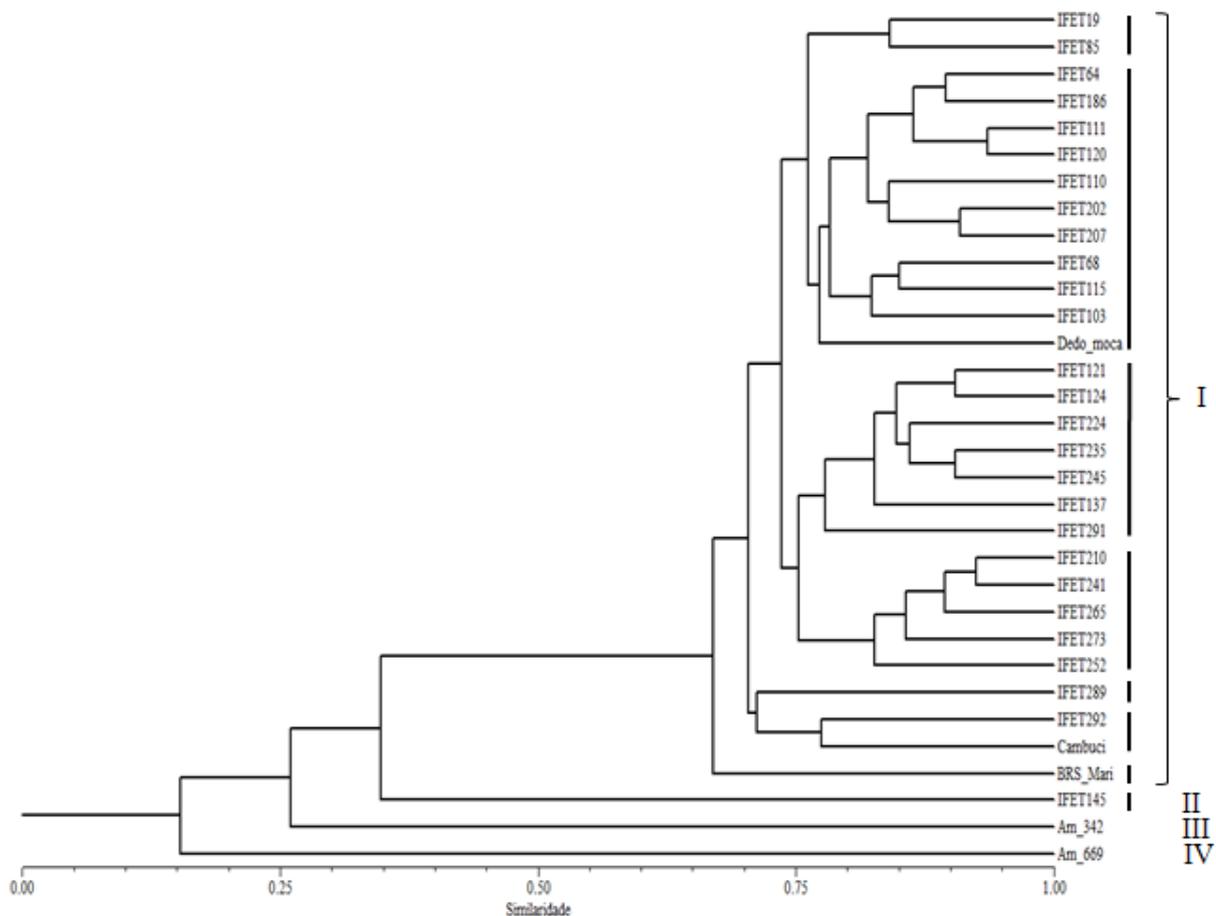


Figura 6: Similaridade entre genótipos de *Capsicum* com base em 57 marcadores ISSR e 34 RAPD, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA.

Considerando-se essa segunda marca (subgrupos), a cultivar BRS Mari não foi agrupada com os demais acessos, nem mesmo com IFET 68, genótipo morfológicamente similar (Figura 3). Assim como na avaliação morfológica, IFET 292 (tipo morfológico cambuci) agrupou-se com o genótipo comercial Cambuci. O acesso IFET 289, uma pimenta tipo dedo-de-moça, agrupou-se com os genótipos cambuci, permanecendo relativamente mais distante dos demais acessos desse mesmo tipo morfológico. Os demais subgrupos formados com diferentes tipos de pimenta evidenciam a diversidade genética entre os acessos de *C. baccatum* var. *pendulum* do BAG, assim como o potencial de geração de heterose em cruzamentos direcionados.

No subgrupo cujas extremidades encontram-se os acessos IFET 210 e IFET 252, dentro do grupo I, os acessos apresentam frutos de formato triangular, com exceção de IFET 252, que possui formato alongado. Alta similaridade foi observada entre os genótipos IFET 210 e IFET 241, com diferença em apenas três bandas no iniciador i32 Zm. O subgrupo entre IFET 121 e IFET 291 englobou genótipos do tipo morfológico dedo-de-moça, uma planta com frutos triangulares (IFET 291), além de acesso do tipo varietal chifre-de-veado (IFET 224). Os acessos IFET 121 e IFET 124 apresentaram alta similaridade entre si, se diferenciando em relação aos iniciadores i12 Zm, i18 Zm, i7 Ps e OPO-7, em uma banda cada um. Contudo, o acesso IFET 121 apresentou segregação para formato de frutos (alongado e triangular, Figura 7). Embora as sementes dos genótipos estudados tenham sido provenientes de autofecundação (1 geração), as sementes originais de cada acesso que compõem a coleção de germoplasma do IF Goiano foram coletadas em campo, portanto, podem ter sido obtidas a partir de fecundação cruzada. Apesar da predominância de autofecundação em *Capsicum*, taxas de fecundação cruzada de 2% a 90%

foram observadas em campo aberto (PICKERSGILL, 1997), dependendo de condições ambientais e da distância física entre as plantas. Além de cruzamentos naturais dentro de uma mesma espécie, pode ocorrer fluxo gênico entre espécies (Carvalho et al. 2006), tendo sido utilizado para transferência de genes de resistência, como, por exemplo, ao *Tobacco Mosaic Virus*, das espécies *C. chinense* e *C. chacoense* para *C. annuum* (PICKERSGILL, 1997).

Ainda no grupo I, subgrupo entre IFET 121 e IFET 291, os genótipos IFET 235 e IFET 245, apresentaram alta similaridade e diferenciaram-se entre si em relação a uma banda de cada um dos seguintes iniciadores: i18 Zm, i7 Ps, OPO-7 e OPF-13. O subgrupo entre IFET 64 e Dedo-de-moça comercial foi composto por genótipos do tipo morfológico dedo-de-moça, exceto por IFET 103, que possui frutos arredondados. Neste subgrupo, IFET 111 e IFET 120 diferenciaram-se entre si em relação a uma banda no iniciador i29 Zm e duas bandas no iniciador i7 Ps. Da mesma forma, IFET 202 e IFET 207 se diferenciaram em três bandas no iniciador i32 Zm e uma banda no iniciador OPR-1. Ainda no grupo I, os acessos IFET 19 (frutos triangulares) e IFET 85 (dedo-de-moça) agruparam-se em um mesmo subgrupo, diferenciados em relação a uma banda no iniciador i18 Zm, duas no iniciador i32 Zm, uma no iniciador R7 e uma no iniciador N7.

Diante da existência de uma maior proximidade genética relativa entre determinadas espécies dentro do gênero *Capsicum*, trabalhos propuseram o conceito de “complexos de espécies”. De acordo com esse conceito, três complexos foram estabelecidos: a) complexo *C. annuum* (*C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. galapagoense*), b) complexo *C. pubescens* (*C. pubescens*, *C. eximium* e *C. cardenasii*) e c) complexo *C. baccatum* (*C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*, *C. baccatum* var. *praetermissum* e *C. tovarii*) (Ince et al, 2010; Albrecht et al., 2012). Considerando o agrupamento molecular, no presente estudo, a clara distinção entre *C. baccatum* e as outras duas espécies inseridas na análise condiz com a sua separação em complexos diferentes.

Por outro lado, a separação entre *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *praetermissum* chama a atenção por ser tão nítida nas análises molecular e morfológica, comparável com a separação como espécies distintas. De fato, a baixa similaridade genética entre essas variedades já foi objeto de discussão no passado. O trabalho de Kochieva et al. (2004), utilizando ferramentas moleculares, apresenta resultados que dão suporte ao reconhecimento da variedade *praetermissum* como uma espécie autônoma (*C. praetermissum*) e não mais uma variedade dentro de *C. baccatum*. Essa conclusão já havia sido apontada por Buso et al. (2002), analisando o DNA cloroplástico e, mais recentemente, por Albrecht et al. (2012). O nível elevado de separação observado no presente estudo, portanto, vem ao encontro de tais observações.

De acordo com a análise morfológica, a distância genética entre os genótipos de pimenta do tipo cambuci dos demais acessos de *C. baccatum* var. *pendulum* avaliados no presente estudo, foi semelhante à distância genética existente entre os acessos de *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *praetermissum*. As pimentas tipo cambuci, também chamadas de chapéu-de-bispo ou chapéu-de-frade, foram classificadas como *C. baccatum* var. *umbilicatum* por Hunziker e Barbosa, com base em suas diferenças morfológicas (ALBRECHT et al., 2012). Entretanto, Carvalho e Bianchetti (2008) a consideraram como um dos tipos característicos de *C. baccatum* var. *pendulum*. Albrecht et al. (2012) também contestou a classificação desse tipo como uma variedade distinta de *C. baccatum* var. *pendulum* em função do agrupamento genético com base em marcadores AFLP (polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados). No presente estudo, de forma semelhante ao trabalho de Albrecht et al. (2012), os genótipos tipo cambuci agruparam-se junto a outros acessos da variedade *pendulum*.

Os vinte descritores morfológicos utilizados não distinguiram IFET 68 de ‘BRS Mari’, apontando a necessidade de um maior número de descritores para diferenciar os acessos, uma vez que na avaliação molecular entre elas observou-se nítida divergência.

Diferenças como essas puderam ser observadas entre a caracterização morfológica e a molecular, embora ambas as análises tenham sido concordantes em outros aspectos, tais como o verificado com o isolamento de IFET 145 em relação aos demais genótipos assim como o agrupamento entre cambuci comercial e IFET 292. A caracterização morfológica se concentrou em características de flores e frutos, enquanto a caracterização molecular é aleatória, devido ao posicionamento dos marcadores moleculares ISSR e RAPD no genoma. As discrepâncias esperadas entre essas duas análises reforçam a importância de seu uso em conjunto para a realização de uma caracterização efetiva do germoplasma. Silva et al (2013) sugerem trinta descritores como mínimos para caracterização de *C. baccatum*.

No presente estudo, destaca-se que a maioria dos genótipos de *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano - *Campus Ceres* pertence à variedade domesticada *pendulum*.

Considerando-se as particularidades desse estudo, principalmente no que se refere à pequena quantidade de descritores morfológicos utilizados, com predominância de características de flores e frutos, a caracterização molecular foi mais eficaz em detalhar a estrutura da variabilidade genética do material estudado que a caracterização morfológica. No entanto, a caracterização morfológica proporcionou o estabelecimento de grupos condizentes com os tipos de fruto existentes, fator de maior importância comercial. Evidencia-se, assim, que neste estudo foi essencial a associação das duas formas de caracterização para promover o conhecimento dos recursos genéticos de *C. baccatum* disponíveis na coleção de germoplasma do IF Goiano- *Campus Ceres*.



Figura 7: Frutos de IFET 121 de três diferentes plantas.

5 CONCLUSÕES

- A maioria dos acessos de *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano pertence à variedade domesticada *pendulum*;
- O número pequeno de descritores morfológicos utilizados não permitiu distinguir o acesso IFET 68 da cultivar BRS Mari;
- Na análise molecular, os agrupamentos não corresponderam a características de formato do fruto, evidenciando que existe alta variabilidade entre os tipos de pimenta;
- Não foram identificadas duplicatas entre os acessos avaliados;
- A caracterização molecular distinguiu mais detalhadamente a estrutura da variabilidade genética do que a caracterização morfológica.

6 REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, E. et al. Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. *Genet Resour Crop Evol*, v. 59, p. 517–538, 2012.
- ARIF, I. A. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *Int. J. Mol. Sci.*, n. 11, p. 2079-2096, 2010.
- AZEVEDO, V. C. R. **Manual de curadores de germoplasma – Vegetal**: Caracterização molecular. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. (Documentos 314)
- BIANCHETTI, L. B.; CARVALHO, S. I. C. Subsídios à coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões de gênero *Capsicum* (Solanáceas). In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. 2005. p. 355-385.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p. 209-215, 2001.
- BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. S. P. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal**: Caracterização morfológica. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa Amazônia Oriental, 2010. 15 p. (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 312, Documentos/ Embrapa Amazônia Oriental 378)
- BUSO, G. S.C. et al. **Espécies silvestres do gênero *Capsicum* coletadas na Mata Atlântica brasileira e sua relação genética com espécies cultivadas de pimenta**: uma primeira abordagem genética utilizando marcadores moleculares. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 7).
- CABRAL, P.D.S et al. Quantification of the diversity among common bean accessions using Ward-MLM strategy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 45, n.10, p. 1124-1132, 2010.
- CARVALHO, S.I.C.; RIBEIRO, C.S.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. ‘BRS Mari’: nova cultivar de pimenta dedo-de-moça para processamento. *Horticultura Brasileira* v.27, p. 571-573, 2009.
- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008.
- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. **Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 27 p. (Documentos, n. 94)
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germoplasma based on RAPD markers. Ribeirão Preto, **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.
- INCE, A. G; KARACA, M; NACI ONUS. Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. *Genet Resour Crop Evol*, v. 56, p. 211–221, 2009.

IPGRI. **Descriptors for Capsicum (*Capsicum* spp.)**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1995. 49 p.

KARP, A. et al. **Molecular tools in plant genetic resources conservation**: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1997.

MOURA, E. F. et al. Identification of duplicates of cassava accessions sampled on the North Region of Brazil using microsatellite markers. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 43, n. 4, 2013.

ONROYAMA, S. S. et al. Coletando, conservando e utilizando a biodiversidade de pimentas em goiás: agregando conhecimento e valor do bioma à agroindústria. **Ateliê Geográfico**, Goiânia, v. 5, n. 2, p. 106-122, 2011.

PERRY, L. Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. **Science**, v. 315, 2007.

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

POWIS T.G et al. Prehispanic use of chili peppers in Chiapas, Mexico. **Plos One**, v. 8, n.11, 2013.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C. Brazilian *Capsicum*: early history and future prospects. **Cronica Horticulturae**, v. 49, n. 3, 2009.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S. C.; Cultivo. In: RIBEIRO, C. S.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008, 200p.

RODRIGUES, J. M. et al. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. **Theor Appl Genet**, v. 99, p. 147-156, 1999.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: Numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 2.1). Exeter, New York. 2000.

RUFINO, J.L.S.; PENTEADO, D.C.S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. Belo Horizonte: Epamig, **Informe Agropecuário**, v.27, n. 235, 2006.

SILVA, W. C. J.; CARVALHO, S. I. C.; DUARTE, J. B. Identification of minimum descriptors for characterization of *Capsicum* spp. germplasm. **Hortic. Bras.**, Vitoria da Conquista, v. 31, n. 2, p. 190-202, 2013.

SUDRÉ, C.P.; GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; RIVA-SOUZA, E. M.; BENTO, C dos S. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p: 283-294, 2010.

CAPÍTULO II
AVALIAÇÃO DE ACESSOS DE *Capsicum baccatum* EM RELAÇÃO
À ANTRACNOSE

RESUMO

A antracnose é a principal doença que afeta os frutos de pimentas *Capsicum* sp. em condições de campo e pós-colheita. Essa doença é causada por várias espécies do gênero *Colletotrichum*, sendo *C. gloesporioides* o agente causal prevalente nas epidemias no Brasil. O controle químico tem sido a técnica mais utilizada contra essa doença, mas, devido à multiplicidade de espécies envolvidas nas epidemias, frequentemente é inadequada. O controle genético é a alternativa mais barata e adequada ao meio ambiente e ao ser humano, uma vez que a maior parte da produção dessa olerícola provém de agricultura familiar, que normalmente não segue os cuidados necessários ao manuseio de agrotóxicos. O Instituto Federal Goiano *Campus Ceres* possui uma coleção de germoplasma de pimentas do gênero *Capsicum* com 320 acessos coletados especialmente em municípios do norte goiano. O presente trabalho teve como objetivo avaliar vinte e sete acessos de *C. baccatum* proveniente desta coleção para resistência à antracnose, em condições de campo. Foi instalado um experimento em delineamento em blocos completos aumentados, com três tratamentos comuns e vinte e sete acessos da coleção. Cada parcela continha três linhas de cinco plantas espaçamento de 1 m entre linhas x 0,8 m entre plantas. Sobre as plantas em frutificação foi distribuído pó proveniente de pimentas com sintomas típicos de antracnose coletadas na Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. Foram avaliadas a incidência e severidade de antracnose em frutos aos 50 e 120 dias após dispersão do inóculo sobre as plantas. Pela morfologia dos conídios o patógeno foi classificado como *C. gloesporioides*. Houve diferença significativa entre os genótipos avaliados com relação à incidência de antracnose, nos dois períodos de avaliação (50 e 120 dias após a dispersão de inóculo), com destaque para o acesso IFET 145. Também houve diferença significativa entre os acessos em relação à severidade da doença em frutos, nos dois períodos avaliados. Os acessos IFET 103, IFET 110, IFET 124, IFET 145, IFET 224, IFET 241, IFET 245, IFET 265, IFET 273 e IFET 291 não diferiram significativamente entre si, e apresentaram as menores médias de severidade da doença aos 50 dias após dispersão do inóculo. Aos 120 dias após dispersão do inóculo, IFET 19, IFET 121, IFET 210 e IFET 252 também foram incluídos ao grupo de acessos com menor média de severidade da doença em frutos, ao passo que IFET 224 apresentou severidade mediana. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que existe variabilidade genética entre os acessos de *C. baccatum* da coleção do IF Goiano em relação à resistência à antracnose e o método de inoculação através de dispersão de pó de frutos de pimenta infectados com o patógeno foi eficiente para se avaliar a resistência de acessos de pimentas à antracnose.

Palavras chave: Recursos genéticos; *Colletotrichum*. Pimenta.

ABSTRACT

Anthracnose is the major disease that affects the fruits of pepper *Capsicum* sp., in the field and post-harvest. This disease is caused by several species of the genus *Colletotrichum*, being *C. gloeosporioides* the prevalent agent in outbreaks in Brazil. Chemical control has been the most used technique against this disease, but because of the multitude of species involved in outbreaks, it is often inadequate. Genetic control is the cheapest and appropriate alternative to environment and human beings, especially because this vegetable crop production comes from small farms, without observing the required care of pesticides handling. Instituto Federal Goiano – *Campus Ceres* (IF Goiano) has a *Capsicum* gene bank with 320 accessions collected especially in the North of the state of Goiás, Brazil. This study aimed to evaluate twenty-seven accessions of *C. baccatum* from the gene bank against anthracnose, in field conditions. An essay was carried out in augmented randomized complete block with three common treatments. On fruiting plants was distributed powder from peppers with typical symptoms of anthracnose collected at Embrapa Vegetables, Brasília-DF. The incidence and the severity of anthracnose on fruits were evaluated at 50 and 120 days after dispersal of inoculum. The pathogen was classified as *C. gloeosporioides* by the morphology of conidia. There was a statistical difference in the incidence of anthracnose in both periods, highlighting IFET 145. There were also significant differences in severity of disease in fruits, in both periods. In most accessions, severity reduction was observed for periods evaluated. The accessions IFET 103, 110 IFET, IFET 124, 145 IFET, IFET 224, IFET 241, IFET 245, IFET 265, IFET 273 and IFET 291 did not show statistical difference, presenting the lowest mean severity 50 days after inoculum dispersal. At 120 after dispersion, the accessions IFET 19, IFET 121, IFET 210 and IFET 252 were also included among the accession with lower average severity, whereas IFET 124 had higher severity than IFET 103 IFET 145, IFET 210, IFET 241, IFET 264 and IFET 291. It can be concluded that there is genetic variability among *C. baccatum* accessions from IF Goiano gene bank in relation to anthracnose resistance and the method of dispersal of pepper powder was effective to evaluate the resistance to anthracnose in pepper at field conditions.

Key words: *Colletotrichum*. Pepper. Genetic resource.

1 INTRODUÇÃO

A antracnose é uma das doenças de maior importância para muitas plantas cultivadas, cuja ocorrência é comum em hortaliças solanáceas, como pimentão (*Capsicum annuum*), pimentas (*Capsicum* spp.) e jiló (*Solanum gilo*) (TOZZE Jr. et al. 2006). A infecção por *Colletotrichum* sp. pode-se dar em toda a parte aérea da planta, mas os sintomas típicos ocorrem no fruto, podendo afetar rapidamente 100% destes em época chuvosa e na presença de alta concentração de inóculo (KUROSAWA e PAVAN, 1997; LOPES e HENZ, 2008). Nos frutos, inicialmente é observada pequena lesão aquosa e deprimida, que rapidamente se expande de tamanho. A lesão completamente expandida possui abundante massa micelial de coloração preta e esporos de coloração salmão, dispersos ou em forma de anéis concêntricos nas lesões (BLACK et al. 1991). A disseminação do patógeno ocorre por sementes infestadas e por respingos de água de chuva ou irrigação (LOPES e HENZ, 2008).

Em Turuçu, RS, devido à incidência de antracnose, o cultivo de pimenta vermelha teve sua área plantada reduzida de 120 ha para 70 ha de 2002 a 2004. Em 2004/2005 estimou-se perdas em mais de 50% na maioria das lavouras (SILVA et al., 2005).

A antracnose em pimentas é causada por diversas espécies do gênero *Colletotrichum*, como *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. capsici*, *C. cocodes*, *C. dematium* e *C. gloeosporioides* (DIAO et al., 2013; THAN et al., 2008; TOZZE Jr, et al., 2009), sendo este último, o principal agente causador da doença no Brasil (TOZZE Jr. et al., 2006).

Tradicionalmente, as espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas pelas características morfológicas a partir de tamanho e forma do conídio e apressório, presença ou ausência de setas e características da cultura *in vitro*, como cor da colônia, taxa de crescimento e textura (THAN et al., 2008). No entanto, Ivey et al. (2004) observaram que a caracterização morfológica não foi suficiente para diferenciar o isolado que estudaram em *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

C. gloeosporioides apresenta conídios retos e cilíndricos, formados geralmente em massas de coloração salmão, medindo de 12-17 x 3,5-6 µm e apressórios clavados, ovados, obovados ou lobados de coloração castanha medindo de 6-20 x 4-12 µm (SUTTON, 1992 citado por AZEVEDO, 2006).

C. acutatum possui conídios retos e fusiformes, medindo 8,5-16,5 x 2,5-4 µm e apressórios clavados, ovados, obovados ou lobados medindo 8,5-10 x 4,5-6 µm. Seu crescimento micelial é menor que *C. gloeosporioides* (AZEVEDO, 2006).

C. cocodes apresenta conídios retos, fusiforme, às vezes com leve constrição no meio, as extremidades afinam abruptamente, medindo 14.6 a 22.6 µm x 2.7 a 5.3 µm. Na caracterização em meio de cultura foram observados micélios brancos aéreos, esparsos, com produção microesclerócios esparsos (TOZZE et al. 2007). Em análise molecular, a reação de PCR com os iniciadores específicos Cc1NF1 e Cc2NR1 amplificam fragmento com 349 pb (CULLEN et al., 2002)

A penetração do fungo ocorre de 24 a 48 horas após inoculação. Quatro dias após inoculação, o micélio desenvolve ao longo da parede celular na subepiderme do pericarpo, sem dano celular visível. Seis dias após inoculação observa-se dissolução da parede celular da subepiderme do colênquima devido à colonização micelial, dando origem à lesão deprimida no fruto, característica da antracnose. Apesar da destruição do colênquima, a cutícula e as células da epiderme adjacente continuaram sem danos e contínuas. Os acérvolos emergem de 7 a 9 dias após inoculação, nesse momento, apresentando lesões escuras que se espalham no fruto (RANATHUNGE et al., 2012).

Atualmente, a única forma eficiente de manejo da doença se dá pelo controle químico (SANTIAGO e UENO, 2010). Porém, segundo Than et al. (2008), práticas de manejo da doença

são frequentemente inadequadas para eliminar a doença devido ao envolvimento das múltiplas espécies de *Colletotrichum* na infecção. Isolados de *C. gloesporioides* normalmente são altamente sensíveis ao benomyl, enquanto *C. acutatum* são tolerantes (FREEMAN et al., 1998, citado por TOZZE Jr et al., 2007).

O desenvolvimento de variedades resistentes também não tem sido bem sucedido (THAN et al. 2008), provavelmente devido à variabilidade e adaptação patógeno/hospedeiro. Mongkolporn et al. (2010) avaliaram frutos maduros e verdes de dez genótipos de *Capsicum* spp. a dez isolados de *C. acutatum*, onze de *C. gloesporioides* e dose isolados de *C. capsici*, constatando interação entre isolado, hospedeiro e estágio de maturação. Neste trabalho, os autores identificaram três patótipos de *C. truncatum* e cinco patótipos de *C. gloesporioides* capazes de infectar frutos maduros, dois patótipos de *C. truncatum*, seis patótipos de *C. gloesporioides* e três patótipos de *C. acutatum* capazes de infectar frutos em maturação fisiológica. Fernandes et al. (2002) estudaram a virulência de *C. gloesporioides* isolados de jiló, berinjela e pimentão, verificando maior virulência do isolado em frutos da espécie de hospedeiros em que foram obtidos. Resultados semelhantes foram observados por Azevedo (2006). Portanto, a diferença na severidade apresentada por genótipos frente a um único isolado não é suficiente para determinar resistência de cultivares à antracnose (MARVEL, 2003). Pereira (2005) não verificou correlação entre reação em plântulas e em frutos, evidenciando certa especialidade do fungo em colonizar determinadas órgãos da planta.

Acredita-se que a cutícula promova uma barreira eficiente contra a maioria dos patógenos que colonizam a superfície da planta e, juntamente com as barreiras químicas, representam uma defesa passiva (MANANDHAR et al., 1995; REINA-PINTO e EYEPHREMOV, 2009). Liao et al. (2012) verificaram que *C. acutatum* forma uma estrutura dendrítica (hifa muito ramificada) na cutícula de fruto verdes de genótipos suscetíveis. Em genótipos resistentes, essa estrutura é formada, ficando com uma coloração preta amarronzada e a lesão não se desenvolve, havendo inclusive a morte de algumas células epiteliais, indicando a presença de algum inibidor na cutícula. Portanto, inoculação envolvendo ferimento em fruto elimina a primeira barreira de proteção contra patógenos, fazendo com que as reações sejam decorrentes dos mecanismos de resistência pós-infecção. A pulverização do patógeno sobre a copa das plantas ou utilização de linhas de dispersão são métodos mais eficientes de se estudar reação da planta a doenças, especialmente quando se trata de experimento envolvendo a avaliação de muitos genótipos (BOITEUX et al., 1995).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a reação de vinte e sete acessos de *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano – *Campus Ceres* em relação à antracnose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Acessos avaliados e implantação do experimento

A avaliação da incidência e severidade de antracnose foi realizada em condições de campo, em frutos verdes e maduros de 27 acessos de *C. baccatum* pertencentes à coleção de germoplasma do IF Goiano *Campus Ceres*. Os acessos avaliados foram IFET 19, IFET 64, IFET 68, IFET 85, IFET 103, IFET 110, IFET 111, IFET 115, IFET 120, IFET 121, IFET 124, IFET 127, IFET 137, IFET 145, IFET 186, IFET 202, IFET 210, IFET 224, IFET 235, IFET 241, IFET 245, IFET 252, IFET 265, IFET 273, IFET 289, IFET 291 e IFET 292.

O cultivo foi realizado na área experimental do Instituto Federal Goiano *Campus Ceres-GO*, com delineamento experimental em blocos completos casualizados aumentados, com três testemunhas comerciais, cambuci, dedo-de-moça e ‘BRS Mari’. As parcelas foram constituídas por 15 plantas em espaçamento de 1,0 m x 0,8 m, deixando-se 2 m entre os blocos.

A semeadura foi realizada no dia 25 de abril de 2012 em bandejas de poliestireno de 128 células contendo substrato comercial Brasplant®. Quando atingiram três a quatro folhas definitivas, as plantas foram repicadas para copos de 250 ml contendo uma mistura de solo, esterco e fertilizantes. O transplante para o campo foi realizado no dia 29 de junho de 2012, com as mudas apresentando aproximadamente oito folhas.

2.2 Obtenção e identificação do inóculo

No dia 8 de março de 2012 foi feita coleta de frutos de pimenta malagueta (*C. frutescens*) e de pimentão (*C. annuum*) infectados com *Colletotrichum* sp. Os frutos foram secos em estufa de ventilação forçada a 36°C, triturados em liquidificador e armazenados em geladeira. A quantidade de conídios do referido patógeno foi determinada colocando-se 1 g do pó em 30 ml de água destilada e feita a contagem em hemacitômetro, resultando em $1,95 \times 10^8$ conídios por grama.

2.3 Inoculação em condições de campo

No dia 08 de novembro de 2012, aproximadamente 65 g (2×10^8 conídios g⁻¹) do pó de frutos infectados com antracnose foram espalhados sobre as plantas do experimento conduzido no IF- Ceres, e a ocorrência de quatro dias de chuvas constantes, asseguraram o período de molhamento necessário para iniciar infecção dos frutos pelos patógeno.

2.4 Avaliação da incidência de antracnose em frutos

A incidência de antracnose nos genótipos de pimenta foi realizada coletando-se aleatoriamente dez frutos por planta, verdes ou maduros (preferencialmente com pleno desenvolvimento), na parte inferior da copa e verificada a presença ou ausência de sintomas. Foram feitas duas avaliações, nos dias 28 de dezembro de 2012 e 13 de março de 2013, aproximadamente 50 e 120 dias após a dispersão de inóculo (DAD) nas plantas.

2.5 Avaliação da severidade de antracnose em condições de campo

Para avaliar a severidade da doença, os frutos amostrados foram seccionados longitudinalmente, quando verificado sintoma, e fotografados com uma máquina digital Canon T3i, objetiva 18–55 mm, abertura de 35 mm (aproximadamente), sensibilidade à luz ISO

variando 3200 a 6400. A partir das imagens, foi determinada a superfície relativa de lesão para cada fruto amostrado utilizando o aplicativo Quant (VALE et al., 2002). Foi considerada a média de percentual de lesão como valor de severidade da doença para cada acesso.

Assim como na avaliação de incidência, foram feitas duas avaliações, aos 50 e 120 dias após dispersão do patógeno. Aos 50 DAD, após a avaliação de incidência, os frutos coletados foram acondicionados em sacos plásticos e deixados em câmara fria até a semana seguinte. Na segunda avaliação, optou-se por coletar os frutos no mesmo dia da avaliação, um bloco por dia.

2.6 Análise estatística dos dados de severidade de antracnose em frutos

A análise estatística foi realizada de acordo com Nogueira e Gomes (1978). A partir dos dados foi gerado o quadro de análise de variância para blocos completos, considerando apenas os tratamentos testemunhas, a fim de estimar o Erro experimental (QMR). Determinado quadrado médio do erro, foi gerado o quadro de análise de variância considerando agora todos os tratamentos do bloco, inclusive as testemunhas.

As médias de severidade dos acessos foram ajustadas de acordo com NOGUEIRA e GOMES (1978). Para comparação das médias, foi aplicado o teste t, com nível de significância de 5%. A diferença mínima significativa DMS foi calculada para comparação das testemunhas, para os acessos do mesmo bloco (Equação 3), para os acessos em blocos diferentes e para comparação testemunha x acessos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação do inóculo

A partir do isolamento do patógeno em BDA e reprodução dos sintomas por reinoculação de frutos de pimenta e pimentão, foi possível identificar o gênero do agente causal como sendo *Colletotrichum*. Os conídios apresentaram formato cilíndrico com ápice arredondado, com comprimento médio de 8,5 μm , variando de 5,1 a 12,6 μm e largura média de 2,5 μm , variando de 2,2 a 3,3 μm (Figura 4). De acordo com a forma dos conídios, segundo Castilho et al. (2007), o agente causal foi classificado como *Colletotrichum gloesporioides*. Resultados da caracterização molecular para confirmação da espécie ainda não foram obtidos.



Figura 4: Conídios de *Colletotrichum gloesporioides* isolados de pimenta dedo-de-moça inoculados com suspensão preparada a partir do pó de pimentas infectadas.

3.2 Incidência de Antracnose em frutos, sob condições de campo

A incidência de *Colletotrichum* sp. na área experimental ocorreu de forma homogênea, confirmando a adequação do método de dispersão do patógeno. Na avaliação aos 50 dias após dispersão do inóculo houve diferença significativa entre os acessos avaliados (Figura 5). IFET 145 apresentou a menor incidência de antracnose dentre todos os acessos estudados. IFET 110 apresentou menor incidência que 58% dos acessos avaliados, IFET 273 menor que 54%, IFET 124, IFET 224, IFET 252 e IFET 291 menor que 46%, IFET 121 menor que 31%, IFET 241 menor que 27% e IFET 292 menor que 12 % dos acessos estudados. Estes acessos não diferiram significativamente entre si. Não foi observada diferença significativa na incidência entre as testemunhas.

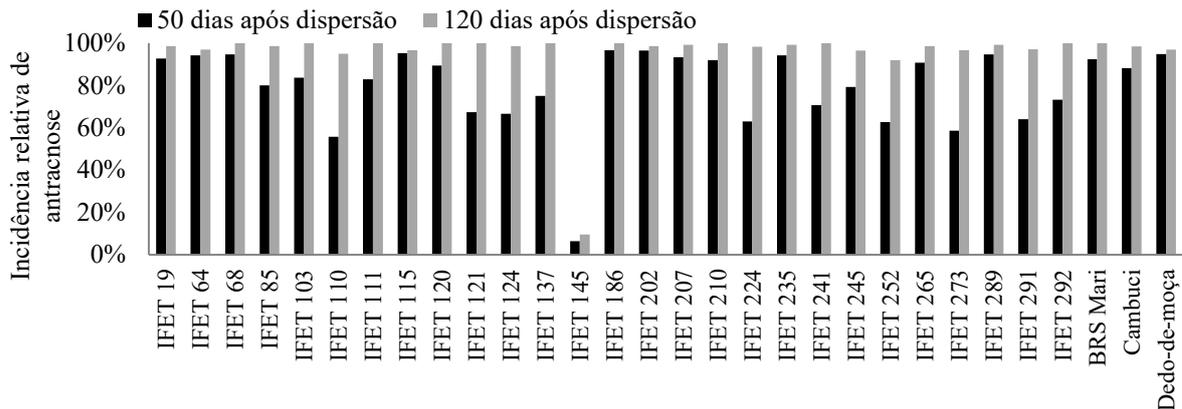


Figura 5: Incidência relativa de antracnose em 30 genótipos de *Capsicum baccatum* 50 dias e 120 dias após dispersão do inóculo.

Na avaliação aos 120 dias após dispersão do inóculo, apenas o acesso IFET 145 diferiu dos demais. A intensa produção de esporos nos frutos doentes, que não foram removidos, aliada às condições ambientais favoráveis e a ausência de controle químico resultaram em forte pressão de doença. Com isso, a avaliação da incidência nesses dois períodos não permite diferenciar os acessos em termos de resistência de campo, salvo em caso de imunidade, o que parece ocorrer com IFET 145.

3.3 Severidade de antracnose em frutos, sob condições de campo

Na avaliação de severidade de doença nos frutos, foi observada diferença significativa entre os acessos e entre as testemunhas nas duas avaliações (Tabela 3), comprovando a existência de diferentes níveis de resistência entre os acessos de *C. baccatum* avaliados. Em geral, houve redução da severidade nos frutos avaliados aos 120 dias em relação à primeira avaliação (Figura 6).

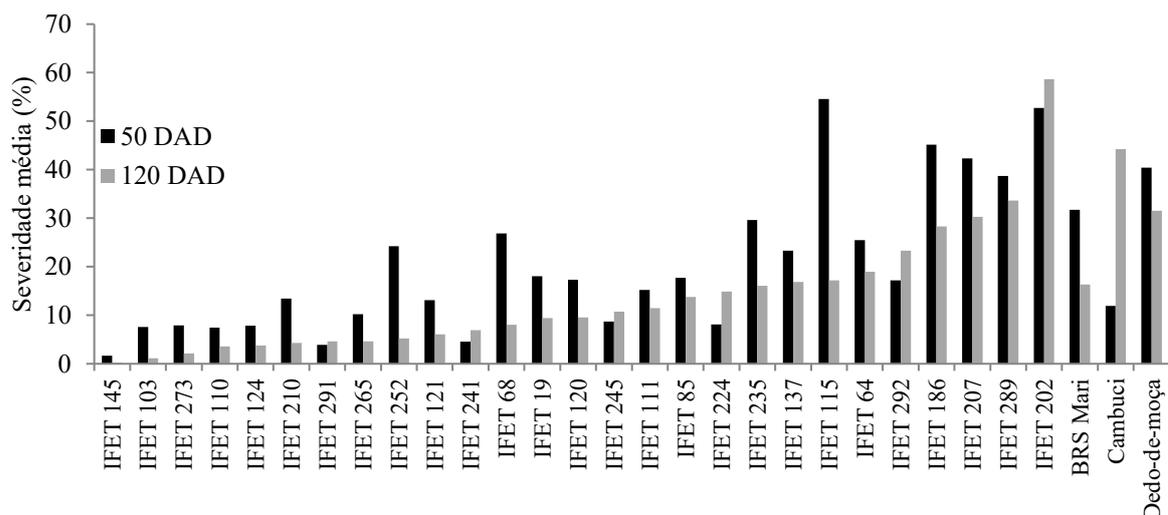


Figura 6: Severidade média de antracnose (*Colletotrichum* sp.), em frutos de 30 genótipos de *Capsicum baccatum*, avaliados aos 50 e 120 dias após dispersão do inóculo (DAD) em campo.

Tabela 3: Teste de médias de severidade de antracnose em frutos de acessos de *Capsicum baccatum* ajustadas, observadas em campo, aos 50 e 120 dias após dispersão (DAD) do inóculo.

Severidade Média							
Acesso	50 DAD			Acesso	120 DAD		
IFET 115	56,0 ¹	a ²	C ³	IFET 202	61,40	a	C
IFET 202	51,7	ab	C	IFET 289	36,43	b	C
IFET 186	46,6	bc	C	IFET 207	32,66	bc	C
IFET 207	43,7	bc	C	IFET 186	30,67	bcd	C
IFET 289	37,7	cd	B	IFET 292	25,71	bcde	B
IFET 235	29,2	de	B	IFET 64	21,74	cdef	B
IFET 68	25,9	ef	B	IFET 137	19,62	cdef	B
IFET 252	25,6	ef	B	IFET 115	19,55	defg	B
IFET 64	24,5	efg	B	IFET 224	17,27	efgh	B
IFET 137	22,3	efgh	A	IFET 085	16,11	efghi	B
IFET 085	19,2	efghi	A	IFET 111	14,27	efghi	B
IFET 120	18,7	fghi	A	IFET 120	11,95	fghij	B
IFET 292	18,6	fghi	A	IFET 235	10,91	fghij	B
IFET 19	17,6	fghi	A	IFET 68	10,83	fghij	B
IFET 121	14,5	ghijk	A	IFET 121	8,42	fghijk	B
IFET 111	14,2	hijk	A	IFET 252	7,57	fghijk	B
IFET 210	13,0	hijk	A	IFET 124	6,54	ghijk	B
IFET 265	9,7	ijkl	A	IFET 110	6,36	ghijk	B
IFET 224	9,5	jkl	A	IFET 245	5,58	ghijk	B
IFET 245	8,3	kl	A	IFET 273	4,92	hijk	B
IFET 103	7,2	kl	A	IFET 19	4,27	hijk	A
IFET 273	6,9	kl	A	IFET 241	1,76	ijk	A
IFET 124	6,9	kl	A	IFET 265	-0,51	jk	A
IFET 110	6,5	kl	A	IFET 291	-0,51	jk	A
IFET 241	4,1	kl	A	IFET 210	-0,86	jk	A
IFET 291	3,5	l	A	IFET 103	-4,00	k	A
IFET 145	1,2	l	A	IFET 145	-4,91	k	A
BRS Mari	31,7		B		16,4		B

Coefficiente de variação: 50 DAD 5%; 120 DAD 6%.

¹média de severidade ajustada ao modelo em blocos aumentados.

²Valores com letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P 0,05) entre os acessos, baseado no teste t.

³Valores com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre os acessos e 'BRS Mari'.

50 DAD: DMS acessos no mesmo bloco= 9,0; DMS blocos diferentes = 10,4; DMS acesso x BRS Mari = 8,5

120 DAD: DMS acessos no mesmo bloco= 12,4; DMS blocos diferentes = 14,4; DMS acesso x BRS Mari = 11,7

A redução na severidade de antracnose na maioria dos acessos e testemunhas pode ser atribuída ao armazenamento dos frutos em câmara úmida após a colheita, antes da primeira avaliação. Os frutos de cada planta foram acondicionados em sacos plásticos, dentro de uma

embalagem maior que separava os genótipos. Estes foram colocados em outro saco, de aproximadamente 20 L ou engradados, com amostras de várias parcelas. Desta forma, a retirada de umidade e a redução de temperatura do ambiente próximo aos frutos foram dificultadas. Diante dessas observações, a avaliação aos 120 dias após a inoculação oferece resultados mais fiéis ao que ocorre no campo, eliminando o fator ligado ao armazenamento. Em todo caso, para efeito de discussão, todos os resultados serão considerados.

Em Cambuci, 18% dos frutos estavam maduros na primeira avaliação, e 52% na segunda. O inverso foi observado em IFET 115 que na primeira avaliação apresentava 60% dos frutos maduros e apenas 2% de frutos maduros na segunda avaliação. IFET 19, IFET 110, IFET 111, IFET 273 e 'BRS Mari' tiveram um maior percentual de frutos maduros na amostra da avaliação aos 120 dias. Porém, foi observada menor média de severidade de doença nesta avaliação em relação à primeira. Inicialmente a avaliação seria realizada apenas com frutos maduros. Todavia, ao se perceber que não haveria frutos suficientes de todos os acessos, a amostra foi casualizada em relação à maturação. A variação da proporção de frutos maduros e verdes nas amostras dos genótipos pode ter contribuído para a variação da média de severidade de doença entre as duas avaliações. A interação entre patógeno e hospedeiro em relação ao estágio de maturação do fruto foi verificado por Mongkolporn et al. (2010).

Na avaliação feita aos 50 dias após dispersão de inóculo, os acessos IFET 103, IFET 110, IFET 124, IFET 145, IFET 224, IFET 241, IFET 245, IFET 265, IFET 273 e IFET 291 não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3), apresentando as menores médias de severidade. IFET 111, IFET 121 e IFET 210 apresentaram valor de severidade maior apenas que IFET 145 e IFET 291.

Aos 120 dias após dispersão de inóculo, os acessos IFET 19, IFET 121, IFET 210 e IFET 252 também integraram o grupo com menor severidade, ao passo que IFET 224 apresentou severidade maior que os acessos IFET 103, IFET 145, IFET 210, IFET 241, IFET 264 e IFET 291, juntamente com os acessos intermediários.

IFET 202 apresentou a maior severidade em campo nas duas avaliações. Trata-se de uma pimenta do tipo dedo-de-moça, altamente suscetível à antracnose. Durante o experimento, foram observados nesse acesso muitos frutos pequenos que se encontravam totalmente tomado por lesões, evidenciando a infecção precoce e o rápido desenvolvimento de doença.

Comparando-se o desempenho dos 27 acessos avaliados com a testemunha 'BRS Mari', que apresenta resistência mediana à antracnose (CARVALHO et al., 2009), na avaliação aos 50 dias DAD de inóculo, dezoito acessos apresentaram severidade da doença inferior a essa cultivar (Tabela 3), cinco acessos foram semelhantes e quatro apresentaram maior severidade. Aos 120 DAD de inóculo, a severidade da doença em 'BRS Mari' reduziu de 31,7% para 16,4%, com isso, o número de acessos com menor severidade, quando comparados a ela, reduziu para sete. Dezesesseis foram semelhantes e quatro apresentaram maior severidade. Os acessos com severidade de doença inferior à observada em BRS Mari, nas duas avaliações, foram IFET 19, IFET 103, IFET 145, IFET 210, IFET 241, IFET 265 e IFET 291.

4 CONCLUSÕES

- Existe variabilidade nos acessos de *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do IF Goiano – *Campus Ceres* em relação à resistência à antracnose;
- Baseado na severidade de doença, nas condições do Centro-Norte Goiano, os acessos IFET 103, IFET 110, IFET 124, IFET 145, IFET 241, IFET 245, IFET 265, IFET 273 e IFET 291 apresentam maior resistência entre os acessos estudados;
- O método de dispersão de inóculo em campo, na forma de pó de pimentas infectadas secas em estufa de ventilação forçada a 36°C, é eficiente para diferenciar os níveis de resistência local entre germoplasma de pimenta (*C. baccatum*).

5 REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, C. P. **Epidemiologia e controle da antracnose em *Capsicum* spp. e identificação de *Colletotrichum* spp. associados às solanáceas cultivadas.** 2006. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília
- BLACK, L.L., et al. **Pepper diseases: A field guide.** Shanhua, Taiwan: AVRDC, 1991. 98p. Publication No. 91-347
- BOITEUX, L. S.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; FONSECA, M. E. N.; BUSO, J. A. Search for sources of early blight (*Alternaria solani*) field resistance not associated with vegetative late maturity in tetraploid potato germplasm. **Euphytica**, v. 83, n. 1, p. 63-70, 1995.
- CARVALHO, S.I.C.; RIBEIRO, C.S.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. ‘BRS Mari’: nova cultivar de pimenta dedo-de-moça para processamento. **Horticultura Brasileira**, v.27, p. 571-573, 2009.
- CASTILHO, L. B.; REIS, A.; HENZ, G. P. **Identificação morfométrica de isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de antracnose em solanáceas.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, n. 29)
- CULLEN, D. W.; LEES, A. K.; TOTH, I. K.; DUNCAN J. M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, v. 51, n. 3, p. 281–292, 2002.
- DIAO, Y. Z.; FAN, J.R.; WANG, Z.W.; LIU, X.L. First Report of *Colletotrichum boninense* causing Anthracnose on Pepper in China. **Plant Disease**, v.97, n.1, p.138-139, 2013.
- IVEY, M. L. L.; NAVA-DIAZ, C.; MILLER, S. A. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature Bell peppers. **Plant Disease**, n.88, v.11, p. 1198-1204, 2004.
- FERNANDES, M. C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, L. R. D. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 4, p. 325-330, 2002.
- KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças das Solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta), In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L. E. A. REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 3 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997, v. 2, p. 665-667.
- LIAL, C. Y.; CHEN, M. Y.; CHEN, Y. K.; KUO, K. C. Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum* spp. **Plant Pathology**, v. 61, p. 262–270, 2012.
- LOPES, C. A.; HENZ, G. P. Doenças e métodos de controle, In: RIBEIRO, C. S.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas *Capsicum*.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 109-126.

MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L.; WANG, T.C. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, v. 79, 1995. p. 380-383

MARVEL, J. K. **Biology and Control of Pepper Anthracnose**. 2003, 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da vida) Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University.

MONGKOLPORN, O.; MONTRI, P.; SUPAKAEW, T.; TAYLOR, P. W. J. Differential reactions on mature green and ripe chili fruit infected by three *Colletotrichum* spp. **Plant Disease**, v. 94, n. 3, 2010.

NOGUEIRA, M. C. S.; GOMES, F. P. Delineamento em blocos casualizados completos aumentados. *Anais da ESA Luiz de Queiroz*, v. 35, 1978.

PEREIRA, M. J. Z. **Reação de acessos de *Capsicum* spp. a *Colletotrichum* sp., agente causal da antracnose das Solanáceas**. 2005. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

RANATHUNGE, N. P. *Colletotrichum truncatum* Pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. **Australasian Plant Pathol.** v. 41, p. 463–473, 2012.

REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 540–549, 2009.

SANTIAGO, M. F.; UENO, B. Efeito de diferentes fungicidas no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da antracnose em pimenta vermelha. **Topical Plant Pathology**. v. 35, supl., 2010

SILVA, L. P.; UENO, B. & MOURA, A. B. Antracnose causa severas perdas na produção de pimenta vermelha no Sul do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, Supl., p. 576, 2005.

THAN, P. P.; PRIHASTUTI, H.; PHOULIVONG, S.; TAYLOR, P. W. J.; HYDE, K. D. Chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. **Journal of Zhejiang University Science B**. v. 9, n. 10, p. 764-778, 2008.

TOZZE et al. First Report of *Colletotrichum boninense* Causing Anthracnose on Pepper in Brazil. **Plant Disease**, v.93, n.1, p.106-106, 2009.

TOZZE JR, H. J. et al. Natural occurrence of *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes causing anthracnose on pepper (*Capsicum annuum* L.) in Brazil. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 418, 2007

TOZZE JR., H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JR., N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

VALE, F. X. V.; FERNANDES FILHO, E.; LIBERATO, J. R. Quant®. Versão 1.0.2, 2002.

CAPÍTULO III
INCIDÊNCIA DE VIROSES EM ACESSOS DE *CAPSICUM BACCATUM*,
EM CONDIÇÕES DE CAMPO

RESUMO

As pimentas da espécie *Capsicum baccatum* compreendem as pimentas dos tipos ou grupos dedo-de-moça, cumari verdadeira ou pimenta de passarinho, cambuci, dentre outras. Como as demais espécies do gênero *Capsicum*, *C. baccatum* também é amplamente infectada por diversos vírus que afetam economicamente o seu cultivo. A fim de caracterizar os acessos de *C. baccatum* da coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, foi avaliada a incidência em campo, em duas épocas de plantio, dos tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), dos potyvírus *Potato virus Y* (PVY), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), e dos vírus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). O delineamento utilizado foi blocos aumentados, sendo avaliados 27 acessos e as três testemunhas comerciais ‘BRS Mari’, cambuci (Feltrin) e dedo-de-moça (Topseed). A semeadura foi realizada em bandejas de 128 células, com posterior repicagem das mudas para copos de 300 ml e transplante para o campo aos 60 dias após semeadura, com a muda apresentando aproximadamente oito folhas definitivas. As parcelas continham quinze plantas distribuídas em três linhas, com espaçamento de 1,0 m x 0,8 m. No primeiro ensaio, o transplante foi realizado em 26 de junho de 2012 e no segundo, em 16 de janeiro de 2013. Foi realizado o teste DAS-Elisa com leitura de absorbância de 405 nm, em leitora de placas, considerando positivas as amostras com valor superior a, pelo menos, duas vezes o observado para os controles negativos. Foram coletadas amostras de plantas com sintomas de virose e quatro plantas assintomáticas em todas as parcelas, totalizando 148 plantas amostradas na avaliação do primeiro experimento e 281 amostras no segundo. Os percentuais de incidência, no primeiro e segundo período avaliados, foram 30% e 7% de amostras com PMMoV, 6% e 27% com CMV, 8% e 12% com PVY, 25% e 22% com PepYMV, 10% e 2% com GRSV, 11% e 0% com TCSV, e 0% e 11% com TSWV. Não foi detectado o vírus PMMoV nos acessos IFET 64, 110, 137, 145, 202, 224, 273, 289 e 292. Não foi detectado o vírus CMV nos acessos IFET 19, 64, 85, 103, 124, 137, 145, 273 e 289. Não foi detectado PepYMV nos acessos IFET 64, 103, 124, 235, 241, 245. Não foi detectado PVY nos acessos IFET 19, 64, 103, 110, 120, 124, 145, 207, 241, 252, 273 e 292. Não foram detectados tospovírus nos acessos IFET 19, 124, 145, 273 e 292. Os acessos listados são potenciais fontes de resistência aos vírus estudados. Contudo, a resistência deve ser confirmada por teste de inoculação artificial em ambiente controlado.

Palavras chave: Pimenta. Resistência, Banco de germoplasma.

ABSTRACT

The *Capsicum baccatum* peppers have domesticated and wild species greatly appreciated in Brazil. Like other peppers of the genus, *C. baccatum* is also widely infected by several viruses, causing significant loss. This study aimed to evaluate the virus incidence at field condition in *C. baccatum* accessions from Instituto Federal Goiano – *Campus Ceres* in two different periods. It was evaluated the incidence of tospovirus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), the potyvirus *Potato virus Y* (PVY), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), the tobamovirus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) and cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV). Seeds were sowed in trays, pricking out seedlings to 300 ml plastic cups and transplanted to the field sixty days after sowing, with approximately eight definitive leaves. Field experiments were carried out in augmented randomized blocks design with twenty-seven accessions and three check treatments. The experimental plots had fifteen plants spaced 1,0 m x 0,8 m in three rolls. At first period, the seedlings were planted June 2012, and DAS-ELISA analyses were proceeded December 2012. At second period, the seedlings were planted January 2013 and analyses proceeded June 2013. Samples of all symptomatic plants and four asymptomatic ones were collected on all plots, totaling 148 plants sampled in the first experiment and 281 in the second one. Samples with absorbance on a plate reader at 405 nm, exceeding value at least twice that shown by the negative control were considered positive. Perceptual virus incidence in the first and second assays were 30% e 7% PMMoV, 6% e 27% CMV, 8% e 12% PVY, 25% e 22% PepYMV, 10% e 2% GRSV, 11% e 0% TCSV, 0% e 11% TSWV. PMMoV was not detected on IFET accessions 64, 110, 137, 145, 202, 224, 273, 289 e 292. CMV was not detected on IFET accessions 19, 64, 85, 103, 124, 137, 145, 273 e 289. PepYMV was not detected on IFET accessions 64, 103, 124, 235, 241, 245. PVY was not detected on IFET accessions 19, 64, 103, 110, 120, 124, 145, 207, 241, 252, 273 e 292. Tospovirus were not detected on IFET accessions 19, 124, 145, 273 e 292. The accessions listed are potential resistance sources to the viruses studied. Nonetheless, the resistance should be confirmed by inoculation under controlled test conditions.

Key words: Pepper; Resistance. Genebank.

1 INTRODUÇÃO

As pimenteiras podem ser infectadas por vírus de diversos gêneros, sendo os mais importantes os tospovirus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), os potyvirus *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), o tobamovirus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) e o cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV) (FERRAZ et al., 2010). Os sintomas são muito variáveis, dependendo da espécie e cultivar de pimenta, da espécie do vírus, do grau de virulência da estirpe do vírus, da época em que a planta foi infectada e das condições ambientais, principalmente temperatura (LOPES e HENZ, 2008).

O tobamovirus PMMoV tem crescido em importância no Brasil provavelmente devido à expansão do cultivo de pimentão em estufa e sua transmissibilidade via semente. Porém, a transmissão desse vírus nas áreas de produção ocorre principalmente de forma mecânica, por ferramentas, trânsito de pessoas e animais e até mesmo pelo contato planta a planta (OLIVEIRA et al., 2010). Susuki et al (2003) verificaram que partículas virais presentes no solo também são capazes de infectar plantas suscetíveis.

O genoma completo do vírus PMMoV possui 6356 nucleotídeos (OLIVEIRA et al., 2010). A resistência de plantas ao PMMoV é determinada pelos genes L^1 a L^4 , sendo os tobamovirus classificados em patótipos P_0 , P_1 , P_{1-2} , P_{1-2-3} , conforme a sua capacidade de suplantar a resistência dos genes L (SUZUKI et al., 2003). Um isolado de PMMoV de Brasília foi capaz de quebrar a resistência dos genes L^1/L^2 , mas não conseguiu infectar um genótipo de *C. chinense* que contém o gene L^3 (OLIVEIRA et al., 2010). Segundo esses autores, a quebra da resistência provavelmente está ligada à sequência de amino ácidos da proteína capsidial. Cezar et al. (2009) identificaram o acesso PI 152225 de *C. chinense* resistente ao patótipo P_{1-2} .

Potato virus Y (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) pertencem ao gênero *Potyvirus* e são transmitidos por pulgões de maneira não persistente, causando mosaico amarelo, deformação e bolhosidade em folhas (LOPES e AVILA, 2003). Os vírus desse gênero possuem uma única molécula de RNA de fita simples com aproximadamente 10.000 nucleotídeos, com uma proteína viral ligada à extremidade 5' do RNA e uma cauda poli-A ligada à extremidade 3' (TRUTA, 2002). O vírus PepYMV foi inicialmente identificado por Inoue-Nagata et al. (2002) causando mosaico amarelo intenso em cultivares resistentes ao PVY, sendo hoje o potyvirus predominante em cultivos de *Capsicum* no Brasil (TRUTA et al., 2004). A ampla variabilidade genética desses vírus dificulta seu controle genético (LOPES e AVILA, 2003). Ainda assim, o controle de potyvirose é baseado no uso de cultivares resistentes, fazendo com que a busca de materiais resistentes seja constante (TRUTA, 2002).

O *Cucumber mosaic virus* (CMV) infecta mais de 1200 espécies de plantas, em regiões de climas temperado e tropical, sendo encontrado no mundo todo (ROOSSINCK, 2002; ZITTER e MURPHY, 2009). Os sintomas comuns do vírus CMV são clorose, malformação, mosaico leve e mosqueado nas folhas, podendo apresentar manchas circulares em folhas e frutos. Os sintomas mais severos são observados quando a infecção ocorre em plantas jovens (ZITTER e MURPHY, 2009). Trata-se de um vírus de RNA tripartido, senso positivo, com aproximadamente 8400 nucleotídeos. Sua transmissão é feita por cerca de oitenta espécies de pulgões, de maneira não persistente e, com baixa eficiência, via semente (ARENAL e PALUKAITIS, 2008). Os afídeos podem adquirir o vírus após se alimentarem durante um minuto em plantas infectadas, mas perdem rapidamente a capacidade de transmitir o vírus (CERKAUSKAS, 2004). O CMV possui várias estirpes, sendo subdivida em subgrupo I e II ou DTL, ToRS e Co. Não há relato do subgrupo I no Brasil (LOPES e AVILA, 2003). Em várias espécies, plantas transgênicas que expressam a proteína capsidial, replicase ou sequências satélites de RNA associado ao CMV têm sido desenvolvidas, expressando alta resistência ao

vírus, porém sem sucesso em *Capsicum* spp. (GRUBE et al., 2000). A resistência genética a CMV foi reportada por esses autores em acesso de *C. frutescens*, e é controlada por mais de um gene.

Os tospovírus mais frequentes em pimentas são o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), o *Graundnut ring spot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). O vírus TSWV é reportado como um dos patógenos mais importantes de *Capsicum* spp., especialmente em *C. annum*, crisântemo e tomate (EPPO, 1999). Os sintomas comuns desses vírus são deformação nas folhas mais jovens, mosaico amarelo, pontuações necróticas, podendo apresentar manchas em forma de anel em folhas e frutos de pimentão e raramente em pimentas (CARMO et al., 2006). Os tospovírus são vírus de RNA tripartido com aproximadamente 17.000 pares de base (de HAAN et al., 1989). Esses vírus são transmitidos por trips, especialmente *Frankliniella occidentalis* e *F. shulzei*, de maneira persistente, causando perdas especialmente nos plantio de novembro a fevereiro. Os tospovírus são capazes de infectar mais de mil espécies vegetais, especialmente *Solanaceae* e *Compositae*, o que dificulta seu controle (HANSSEN et al., 2010; LOPES e AVILA, 2003). Esforços têm sido feitos no mundo todo para se obter cultivares com resistência genética (LOPEZ et al., 2011). Apenas os genes dominantes *Tsw* e *Sw-5* foram encontrados conferindo resistência ampla a tospovírus (BLACK, 1991; LOPEZ et al., 2011). O gene de resistência *Tsw* é exclusivo ao TSWV e o gene *Sw-5* confere resistência também aos vírus GRSV e TCSV (SOLER et al., 2003). Hoang et al. (2013) levantaram suspeita de que a resistência ao TSWV pode ser controlada por um grupo de genes de resistência no mesmo alelo *Tws* ou próximo a ele. Essa resistência pode ser quebrada em temperaturas de 30°C em plantas jovens (MOURY, et al, 1998).

O método mais utilizado para avaliação de resistência a vírus consiste na inoculação mecânica (CEZAR et al., 2009; INOUE-NAGATA et al., 2010; SOLER et al., 2003). Entretanto, apesar da pouca repetitividade, a avaliação em campo é uma ferramenta importante na busca por genótipos resistentes uma vez que os mecanismos de resistência nessas condições podem ser desconsiderados em programas de prospecção artificial (ALLEN et al., 1982; SAIDI e WARADE., 2008), assim, plantas com bons resultados no campo podem ser consideradas suscetíveis em condições artificiais (SOLER et al. 2003).

O objetivo deste trabalho foi realizar uma prospecção nos acessos de *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma de pimentas do Instituto Federal Goiano – *Campus Ceres*, sob condições de infecção natural, em campo, a fim de identificar possíveis fontes de resistência às principais viroses que acometem essa cultura.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi avaliada a infecção por tospovírus (*Tomato spotted wilt virus* -TSWV; *Groundnut ringspot virus* -GRSV; *Tomato chlorotic spot virus* -TCSV), potyvírus (*Potato virus Y* -PVY; *Pepper yellow mosaic virus* -PepYMV), cucumovírus (*Cucumbe rmosaic virus* -CMV) e tobamovírus (*Pepper mild mottle virus* -PMMoV) em acessos de *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano - *Campus* Ceres, cultivados em duas épocas de plantio, sob condições de campo e infecção natural, em Ceres, GO.

O primeiro ensaio teve a semeadura realizada no dia 25 de abril de 2012 e transplante para campo no dia 29 de junho de 2012. O segundo foi semeado em 6 de novembro de 2012 e transplantado para campo em 16 de janeiro de 2013. As mudas foram produzidas em bandejas de 128 células preenchidas com substrato comercial Brasplant, sendo posteriormente repicadas para copos plásticos de 250 ml preenchidos com mistura de solo, substrato comercial, esterco e fertilizantes. As mudas, com aproximadamente oito folhas verdadeiras, foram transplantadas para o campo no espaçamento de 1 m entre linha e 0,8 m entre plantas.

Foi utilizado delineamento experimental em blocos aumentados com três testemunhas comerciais. Cada parcela foi composta por quinze plantas distribuídas em três linhas. Entre os blocos foi deixado um espaçamento de 2 m. As testemunhas utilizadas foram a cultivar BRS Mari, uma cambuci (Feltrin) e uma dedo-de-moça (Topseed).

As plantas foram conduzidas segundo recomendações para plantios comerciais, sendo eliminados os ramos ortótopos até a primeira bifurcação, utilizando tesoura comum desinfestada com álcool 70% e adubações em cobertura com nitrogênio e potássio. Não foram realizadas pulverizações de inseticidas ou fungicidas nas plantas, uma vez que era desejada a presença de vetores de vírus.

2.1 Amostragem dos acessos

As amostras de plantas para análise sorológica consistiram da coleta da extremidade de três ramos localizados em posições diferentes da planta, especialmente as folhas novas, material utilizado na análise. As amostras coletadas foram colocadas em sacos plásticos numerados em sequência e, imediatamente, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo. Ao final da coleta, as amostras foram armazenadas em refrigerador para, no dia seguinte, serem levadas ao laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliça. Foram amostradas todas as plantas sintomáticas e outras quatro assintomáticas de cada parcela.

2.2 Teste sorológico

Foi realizado o teste DAS-Elisa (*Double antibody sandwich* - *Enzyme-linked immunosorbent assay*; CLARK e ADAMS, 1977) com anticorpos específicos para cada espécie de vírus, produzidos na Embrapa Hortaliças. Os testes foram realizados no Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças nos dias 21 de outubro e 18 de dezembro de 2012, relativos às amostras coletadas de plantas do plantio de junho/dezembro de 2012; e no dia 26 de junho de 2013, relativos às amostras de plantas do plantio de janeiro/junho de 2013. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram valor de absorbância superior a, pelo menos, duas vezes o maior valor do controle negativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período junho a dezembro 2012 poucas plantas apresentaram sintomas típicos de viroses. Ainda assim, pelo teste DAS-ELISA realizado em dezembro de 2012, das 148 amostras coletadas, 59% estavam infectadas, sendo 24% com infecção mista. As infecções mistas mais frequentes foram PMMoV/GRSV (7 amostras) e PMMoV/TSWV (5 amostras). A avaliação realizada em outubro de 2012 não foi considerada devido a problemas relacionados ao teste sorológico. O excesso de extrato da amostra aderido à placa de ELISA comprometeu a leitura de absorbância (Figura 7).

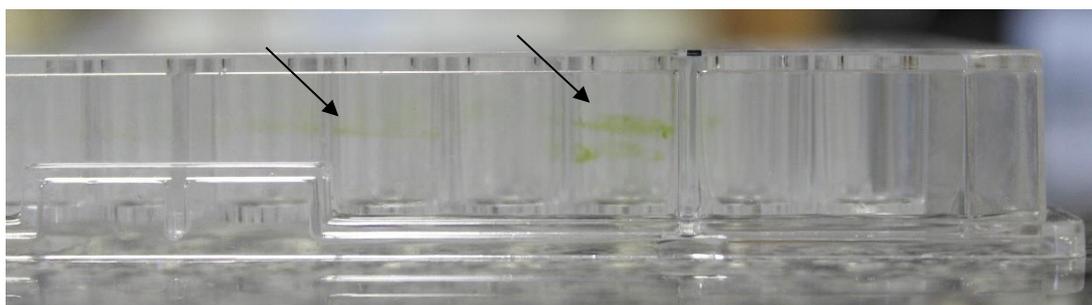


Figura 7. Extrato de folha de pimenta para teste sorológico aderido à placa de Elisa.

Das 281 amostras do plantio de janeiro/junho de 2013 analisadas, 52% estavam infectadas, sendo 28% com infecção mista. As infecções mistas mais comuns foram CMV/PepYMV (16 amostras) e CMV/PVY (11 amostras), mas outras combinações de vírus foram verificadas em infecção mista.

Na Figura 8 são mostrados os percentuais de infecção simples e mista por acesso nas duas avaliações. Nota-se que apenas IFET 124, IFET 64, IFET 145, IFET 19 e IFET 273 não apresentaram infecções mistas. Esses acessos também apresentaram as menores taxas de infecção por vírus, exceto IFT 273.

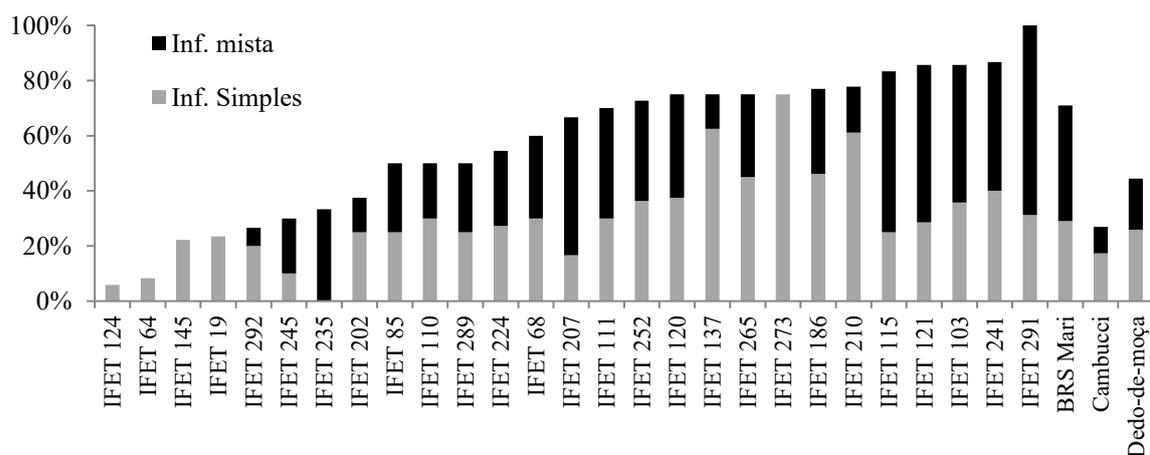


Figura 8: Percentual de infecção por vírus em acessos de *Capsicum baccatum*, avaliados em dois períodos de cultivos.

No período junho/dezembro de 2012, o vírus encontrado com maior frequência foi o PMMoV, presente em 30% das amostras (Figura 9). Esse vírus foi detectado em dezessete acessos avaliados. Já na avaliação janeiro/junho de 2013, a frequência caiu para 7% das

amostras, infectando sete acessos dos 27 avaliados. Além da redução do número de acessos infectados, também foi menor o percentual de plantas infectadas. Considerando apenas os acessos em que foi constatado o vírus PMMoV, o percentual de plantas infectadas caiu de 49% para 19%, em média. O elevado percentual de infecção por PMMoV é preocupante, uma vez que a sua transmissão via semente (OLIVEIRA et al., 2010) pode prejudicar a qualidade do germoplasma armazenado, intercambiado e conseqüentemente, os futuros trabalhos de melhoramento genético. Lima et al. (2010a) constataram a presença de PMMoV em pimenteiras obtidas de sementes oriundas da coleção do IF Goiano em 20% das amostras coletadas. Ferraz et al. (2010) também verificaram incidência de PMMoV em 19% de amostras de *C. frutescens* do BAG da Embrapa Hortaliças, evidenciando a elevada incidência desse vírus em sementes.

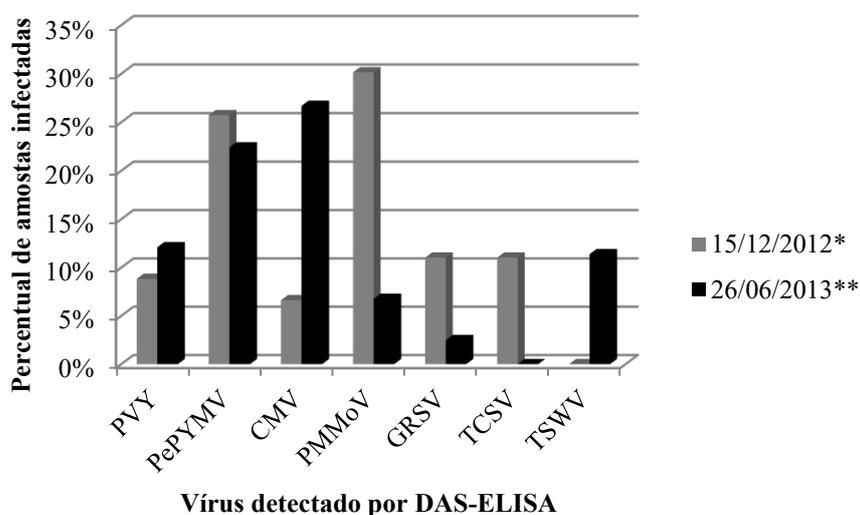


Figura 9: Taxa de infecção de Potato virus Y – PVY, *Pepper yellow mosaic virus* - PePYMV, *Cucumber mosaic virus* – CMV, *Pepper mild mottle virus* –PMMoV, *Groundnut ring spot virus* –GRSV, *Tomato chlorotic spot virus* – TCSV e *Tomato spotted wilt virus* - TSWV em acessos de *C. baccatum* em diferentes épocas. * Transplante 29/6/12; 148 plantas amostradas; ** Transplante 16/1/13; 281 plantas amostradas.

Nos acessos IFET 64, IFET 110, IFET 137, IFET 145, IFET 202, IFET 224, IFET 289 e IFET 292, o vírus PMMoV não foi detectado em nenhuma das amostras coletadas nas duas épocas de plantio (Figura 10). O acesso IFET 273 não apresentou infecção no período junho/dezembro de 2012, mas não foi avaliado em janeiro/junho. IFET 111, no qual não havia sido detectada a presença desse vírus na primeira avaliação, teve 33% de suas amostras positivas na segunda. Entre as testemunhas, BRS Mari apresentou 58% de amostras infectadas com PMMoV no período junho a dezembro de 2012 e 26% no período janeiro a junho de 2013. A cambuci comercial (Feltrin) apresentou 33% de amostras infectadas com PMMoV no primeiro período e 3% no segundo. Enquanto a dedo-de-moça comercial (Topseed) apresentou a incidência de 7% de PMMoV apenas nas amostras coletadas no período de janeiro a junho de 2013.

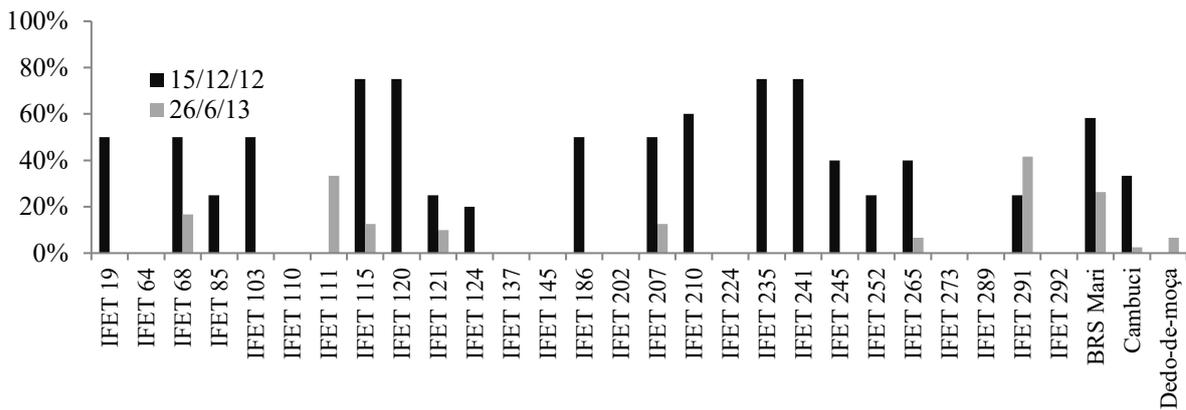


Figura 10: Percentual de infecção por *Pepper mild mottle virus* – PMMoV em dois períodos de avaliação em acessos de *Capsicum baccatum*.

Foi observada pequena variação na incidência dos Potyvírus PVY e PepYMV, sendo predominante o PepYMV nos dois períodos avaliados (Figura 9). A incidência de PVY aumentou de 8%, no período junho a dezembro de 2012, para 12% no período janeiro a junho de 2013. O número de acessos infectados por esse vírus também subiu de seis para doze (Figura 11). No entanto, o percentual de incidência nos acessos infectados, caiu de 41% para 31%, em média. Os acessos IFET 210 e IFET 265 apresentaram níveis de infecção abaixo de 10% na segunda avaliação. Os acessos IFET 121 e IFET 289 apresentaram alto índice de infecção, porém apenas em uma das avaliações, IFET 289 na primeira e IFET 121 na segunda. IFET 291 foi o único acesso em que foi detectada a presença de PVY nas duas épocas avaliadas, com infecção em 50% das amostras, na primeira avaliação, e 58% das amostras, na segunda. Entre as testemunhas, dede-de-moça não foi infectada, cambuci teve uma parcela infectada na segunda avaliação e, ‘BRS Mari’, na primeira avaliação, apresentou uma amostra infectada das quatro amostras analisadas e, na segunda avaliação, uma parcela com 50% de amostras infectadas.

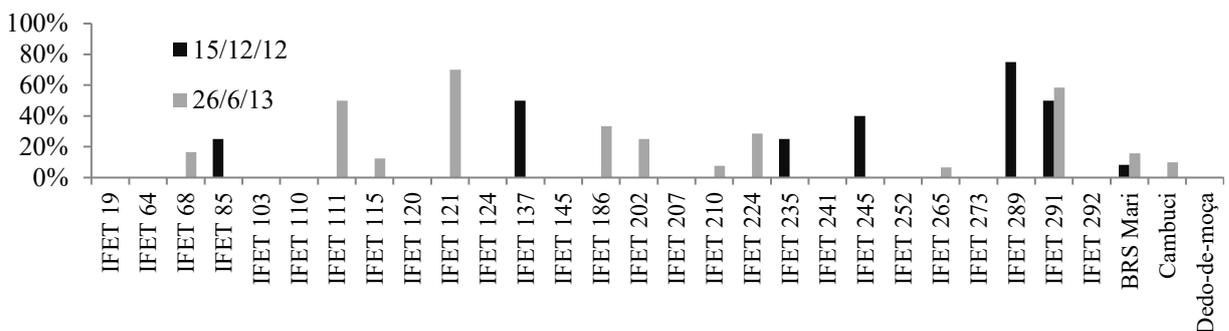


Figura 11: Percentual de infecção por *Potato virus Y* – PVY em dois períodos de avaliação em acessos de *Capsicum baccatum*.

A incidência do vírus PepYMV foi de 25% no período junho a dezembro de 2012 e 22% de janeiro a junho de 2013 (Figura 9), sendo onze acessos infectados na primeira avaliação e quinze na segunda (Figura 11). O percentual de incidência nos acessos infectados reduziu de 62% para 34%. O vírus PepYMV foi detectado em cinco acessos nas duas avaliações, e em seis acessos, não foi detectado em nenhuma das duas avaliações (Figura 12). As testemunhas apresentaram níveis de infecção relativamente baixos. ‘BRS Mari’, tida como moderadamente resistente a esse vírus (CARVALHO et al., 2009), apresentou 8% de amostras infectadas na primeira avaliação e 32% na segunda. Em duas plantas de IFET 19 e uma de IFET 68, que tiveram reação positivas no teste ELISA na segunda avaliação, não foi observado sintoma de

infecção, não devendo ser descartado em estudos posteriores para confirmação de resistência. Em IFET 186, apesar de detectado infecção mista, também não apresentou sintomas de viroses.

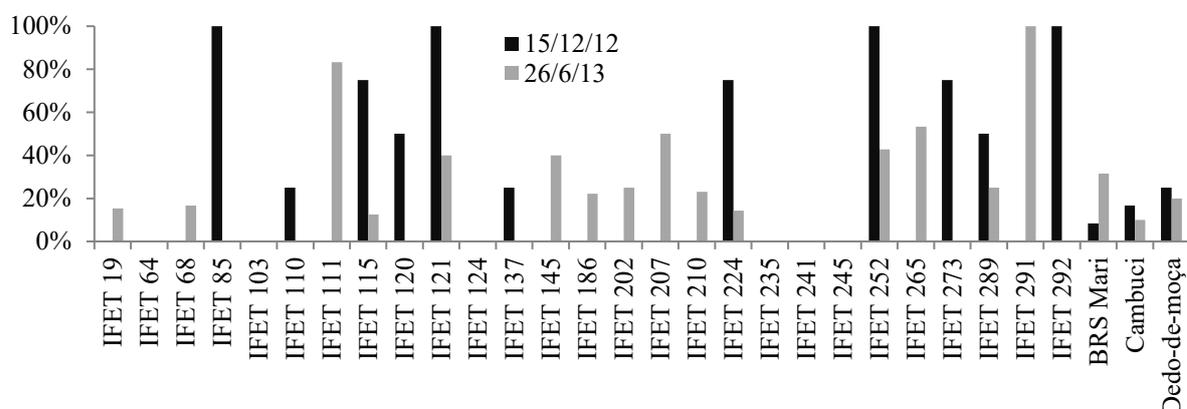


Figura 12: Percentual de infecção por *Pepper yellow mosaic virus* - PepYMV em dois períodos de avaliação em acessos de *Capsicum baccatum*.

Ferraz et al. (2010) verificaram predominância de PVY (67%) no BAG da Embrapa Hortaliças. Entretanto, Lima et al (2010a), também na Embrapa Hortaliças, detectaram 66% amostras de *C. baccatum* var. *praetermissum* infectadas com PepYMV. Na coleção de germoplasma do IF Goiano, Lima et al. (2010b) verificaram incidência de PVY e PepYMV em 14% das amostras.

A incidência do vírus CMV foi de 6% no período junho a dezembro de 2012 e 27% de janeiro a junho de 2013. O número de genótipos infectados, incluindo as testemunhas, aumentou de seis para quinze. Considerando apenas os acessos que apresentaram esse vírus, a média de amostras infectadas subiu de 35% para 47%.

Nove acessos não apresentaram infecção por CMV nas duas avaliações (Figura 13). O acesso IFET 241 apresentou 9% de amostras infectadas na segunda avaliação e nenhuma na primeira. Os acessos IFET 286, IFET 210 e IFET 291 foram os únicos que apresentaram infecção nos dois períodos avaliados, em níveis relativamente elevados. Nas testemunhas, houve incidência de CMV apenas na segunda avaliação. Os índices de incidência de CMV na segunda avaliação foram 67% em ‘BRS Mari’, 53% em Cambuci e 86% em Dedo-de-moça.

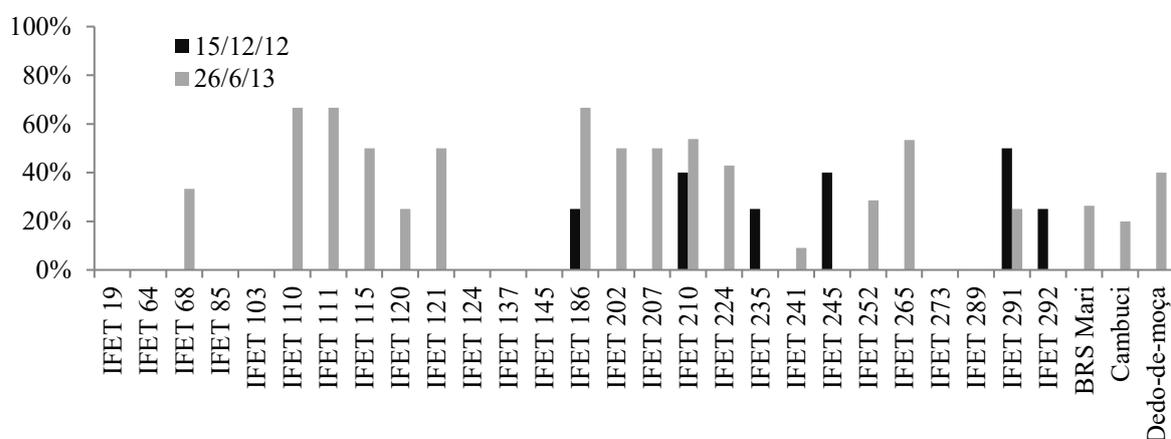


Figura 13: Percentual de infecção por *Cucumber mosaic virus* – CMV em dois períodos de avaliação em acessos de *Capsicum baccatum*.

A incidência do tospovírus GRSV diminuiu de 10% no plantio de junho a dezembro de 2012 para 2% do plantio de janeiro a junho de 2013. O vírus TCSV foi detectado em 11% das amostras do primeiro plantio e não foi detectado em amostras de plantas do segundo plantio. O tospovírus TSWV, que não foi detectado no período de junho a dezembro de 2012, foi detectado em 11% das amostras coletadas no período janeiro a junho de 2013 (Figura 9). O vírus GRSV infectou onze acessos no período de junho a dezembro de 2012 e quatro acessos no período de janeiro a junho de 2013. O vírus TCSV foi detectado em doze acessos no período de junho a dezembro de 2012 e não foi detectado no período de janeiro a junho de 2013. O vírus TSWV não foi detectado no período de junho a dezembro de 2012 e em dezessete acessos no período de janeiro a junho de 2013, sendo o mais frequente dentre os tospovírus nesse período. O tospovírus mais frequente observado por Ferraz et al. (2010), em Brasília, foi TSWV, presente em 24% das amostras.

A transmissão de tospovírus é exclusivamente realizada por trips de maneira persistente-propagativa ou circulativa-propagativa, sugerindo menor atividade do vetor no período de janeiro a junho. Os tospovírus são capazes de infectar mais de mil espécies vegetais, o que os torna disponíveis ao longo de todo ano (LOPES e AVILA, 2003).

No período de junho a dezembro de 2012 não foram detectados tospovírus nos acessos IFET 19, IFET 64, IFET 121, IFET 124, IFET 145, IFET 202, IFET 224 e IFET 292 (Figura 14). Entre as testemunhas, ‘BRS Mari’ apresentou 25% de amostras infectadas, Cambuci comercial 17% e Dedo-de-moça comercial 8%, todas infectadas por TCSV.

No período de janeiro a junho de 2013 não foram detectados tospovírus nos acessos IFET 19, IFET 64, IFET 85, IFET 103, IFET 124, IFET 145, IFET 235, IFET 245, IFET 289 e IFET 292 (Figura 13B). O acesso IFET 273 não foi avaliado nesse período. Entre as testemunhas, ‘BRS Mari’ teve 21% de amostras infectadas e Dedo-de-moça comercial 7%, ambas por TSWV.

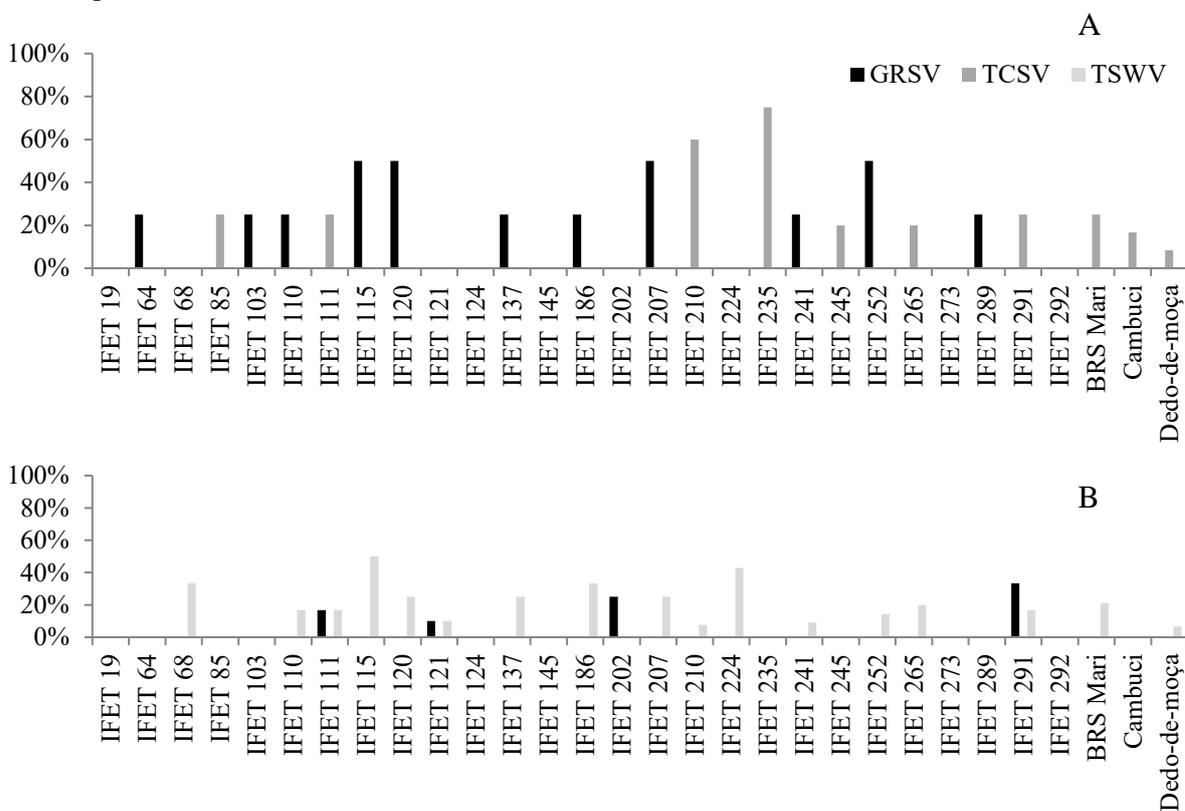


Figura 14: Percentual de infecção por Tospovirus no período de junho a dezembro de 2012(A) e janeiro a junho de 2013 (B) em acessos de *Capsicum baccatum*. GRSV - *Groundnut ring spot virus*; TCSV - *Tomato chlorotic spot virus*; TSWV – *Tomato spotted wilt virus* -

Fatores ambientais podem ter favorecido o aumento de plantas infectadas pelo tospovírus TSWV. Soler et al. (1998) verificaram que plantas de *C. chinense* inoculadas com TSWV no estágio de quatro folhas não desenvolveram infecção sistêmica sob temperatura diurna/noturna de 25°C e quando inoculadas sob temperaturas 30/18°C, todas as plantas desenvolveram infecção sistêmica. Apesar das mudas terem sido transplantadas bem desenvolvidas, a temperatura foi menor na fase inicial de desenvolvimento das plantas no período junho/dezembro de 2012 do que em janeiro/junho de 2013.

4 CONCLUSÕES

Os acessos de *Capsicum baccatum* que não tiveram amostras infectadas pelo respectivo vírus, nas duas épocas de plantio, foram:

- PMMoV: IFET 64, IFET 110, IFET137, IFET 145, IFET 202, IFET 224, IFET 273, IFET 289 e IFET 292.
- CMV: IFET 19, IFET 64, IFET 85, IFET 103, IFET 124, IFET 137, IFET 145, IFET 273 e IFET 289.
- PepYMV: IFET 64, IFET 103, IFET 124, IFET 235, IFET 241 e IFET245.
- PVY: IFET 19, IFET 64, IFET 103, IFET 110, IFET 120, IFET 124, IFET 145, IFET 207, IFET 241, IFET 252, IFET 273 e IFET 292.
- GRSV, TCSV e TSWV: IFET 19, IFET 124, IFET 145, IFET 273 e IFET 292.

Os acessos listados são potenciais fontes de resistência aos vírus estudados. Contudo, a resistência deve ser confirmada por teste de inoculação artificial em condições ambientais controladas.

5 REFERÊNCIAS

ALLEN, D.J.; THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H.W. Cowpea mottle virus: field resistance and seed transmission in virus-tolerant cowpea. **Annals of Applied Biology**, v. 100, n. 2, 1982.

ARENAL, F. G.; PALUKAITIS, P., Cucumber Mosaic Virus. In: Mahy, B. W.J.; van Regenmortel, M. H.V. **Encyclopedia of Virology** 3ed. Oxford, Academic Press, p. 614-619, 2008, Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744104006403>>; Acesso em: 03 nov. 2013.

BLACK, L. L. Tomato spotted wilt virus resistance in *Capsicum chinense* PI 152225 and PI 159236. **Plant Dis.** v. 75, n. 8. p. 863, 1991.

CARMO, M. G. F.; ZERBINE Jr., F. M.; MAFFIA, L. A. Principais doenças da cultura da pimenta. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 27, n. 235, 2006.

CERKAUSKAS, R. **Pepper disease: Cucumber Mosaic Virus**. AVRDC, 2004. (Fact sheet)

CEZAR, M.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M. A.; COSTA, C. P. Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de *Capsicum* spp. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 39-43, 2009.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**. v.34, p.475-483, 1977.

DE HAAN, P. et al. Molecular cloning and terminal sequence determination of the s and m RNAs of tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 12, p. 3469-3473, 1989.

EPPO. **Data sheets on quarantine pests: Tomato spotted wilt tospovirus**. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 29, 465-472, 1999.

FERRAZ, R. M.; LIMA, M. F.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Incidência de viroses em 32 genótipos de *Capsicum frutescens*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, 2010 (supl.)

GRUBE, R. C., et al. New source of resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Capsicum frutescens*. **Plant Disease**, v. 84, p. 885-891, 2000.

HANSEN, I. M., LAPIDOT, M.; THOMMA, B. P. H. J. Emerging viral diseases of tomato crops. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 23, p. 539-548, 2010.

HOANG, N. H.; YANG, H. B.; KANG, B. C. Identification and inheritance of a new source of resistance against Tomato spotted wilt virus (TSWV) in *Capsicum*. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 8-14, 2013.

INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M. F.; CARVALHO, S. I. C.; LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Avaliação das linhagens-élite do Programa de Melhoramento de

Capsicum da Embrapa Hortaliças quanto à resistência a infecções virais. Brasília: **Tropical Plant Pathology**, v. 35, 2010. (Suplemento)

INOUE-NAGATA, A. K. et al. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**, v. 147, n.849–855, 2002.

LIMA, M. REIFSCHNEIDER, F. J. B.2; FERRAZ, R. M. Natural incidence of viruses affecting “Cumari” hot pepper in Central Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, 2010.a (Suplemento)

LIMA, M. F. et al. Detecção e incidência de vírus em 89 acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) no Município de Ceres, Goiás. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p.1187-1194, 2010.b

LOPES, C. A.; HENZ, G. P. Doenças e métodos de controle, In: RIBEIRO, C. S.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 109-126.

LOPES, C. A.; AVILA, A. C. **Doenças do pimentão: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 96 p.

LOPEZ, C. Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 210-215, 2011.

MOURY, B. et al. High temperature effects on hypersensitive resistance to Tomato spotted wilt Tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 104, p. 489–498. 1998.

OLIVEIRA, L. M.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. Complete genome nucleotide sequence of *Pepper mild mottle virus* isolated in the Federal District, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 6, p. 373-376, 2010.

ROOSSINCK, M. J. Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. **Journal of Virology**, v. 76, n.7, p. 3382-3387, 2002.

SAIDI, M.; WARADE, S. D. Tomato breeding for resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV): an Overview of Conventional and Molecular Approaches. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, v. 44, n. 3, p. 83–92, 2008.

SOLER, S.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; NUEZ, F. Control of diseases induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. **Phytopathol Mediterr.**, v. 42, p. 207–219, 2003.

SUSUKI, K. et al. Screening and field trials of virus resistant sources in *Capsicum* spp. **Plant Disease**, n. 87, p. 779-783, 2003.

TRUTA, A.A.C., et al. Identidade e propriedades de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 160-168. 2004.

TRUTA, A. A. C., **Identidade e propriedade de isolados de potyvírus provenientes de Capsicum spp**. Universidade Federal de Viçosa, 2002. (Tese)

ZITTER, T. A.; J. F. MURPHY. **Cucumber mosaic**. *The Plant Health Instructor*. 2009.
Disponível em:
<<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/Cucumbermosaic.aspx>>;
Acesso em: 10 Fev 2014.

CONCLUSÕES GERAIS

Em termos gerais podemos concluir que:

- A coleção de germoplasma do Instituto Federal Goiano - *Campus Ceres* possui variabilidade genética nos acessos de *Capsicum baccatum* avaliados, que pode ser explorada no melhoramento genético da espécie.
- Não existem duplicatas entre os acessos estudados.
- A reação de resistência à antracnose é variável entre os acessos de *C. baccatum* estudados, com genótipos que apresentam baixos valores de severidade da doença.
- Vários acessos de *C. baccatum* não apresentaram incidência de viroses em condição de campo, porém precisam ter sua resistência confirmada em inoculação artificial.

ANEXOS

ANEXO A - Soluções utilizadas na extração de DNA, reação de PCR e revelação de bandas em gel de agarose.

ANEXO B - Tabela 4: Características morfológicas de acessos de *Capsicum baccatum* do Banco de Germoplasma do Instituto Federal Goiano – *Campus Ceres*.

ANEXO C - Géis de agarose em caracterização molecular de *Capsicum baccatum*.

ANEXO D - Tabela 5: Interpretação das bandas apresentadas pelos marcadores ISSR em caracterização molecular de *Capsicum baccatum*.

ANEXO E - Tabela 6: Interpretação das bandas apresentadas pelos marcadores RAPD.

ANEXO F - Tabela 7: Representação esquemática dos dados no delineamento em blocos completos casualizados aumentados (adaptado de NOGUEIRA e GOMES, 1978).

ANEXO G - Tabela 8: Esquema de análise de variância para o experimento, em blocos completos casualizados aumentados.

ANEXO H - Equação para ajuste de médias para blocos completos casualizados aumentados (NOGUEIRA e GOMES, 1978).

ANEXO I - Diferença mínima significativa (DMS) para teste t para comparação de médias entre testemunhas (Equação 2), entre acessos de mesmo bloco (Equação 3), entre acessos de blocos diferentes (Equação 4) e entre acessos e tratamento testemunha (Equação 5).

ANEXO J – Croqui experimental

ANEXO K - Protocolo para realização do teste *Double antibody sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay* DAS-ELISA (CLARK e ADAMS, 1977)

ANEXO L – Soluções utilizadas no DAS-ELISA

ANEXO N – Exemplares de acessos de *Capsicum baccatum* estudados.

ANEXO A – Soluções utilizadas na extração de DNA, reação de PCR e revelação de bandas em gel de agarose.

Tampão de extração 2X: 500 ml

CTAB 10 g
NaCl 81,2 g
PVP-40 10 g
Tris-HCl 60 ml
EDTA (0,5 M pH 8) 40 ml

Obs: dissolver em um pouco de água morna o CTAB, NaCl e PVP e adicionar as outras soluções. Completar o volume para 500 ml.

CTAB – hexadecyotrimethyl-ammonium bromide

PVP – polivinil pirrolidone

Clorofórmio-álcool isoamílico: 250 ml

240:1 clorofórmio: isoamílico

TE (Tris – EDTA)

10 mM de Tris-HCl – 10 ml de um estoque Tris-HCl 1 M pH 8

1 mM de EDTA ml de estoque EDTA 0,5 pH 8

Completar o volume para 1000 ml

TBE (Tampão de corrida)

Tris base 21 g
Ac. Bórico 110 g
EDTA (sal dissódio) 14,88 g
Completar o volume para 2000 ml
Acertar o pH para 8,3

Tampão de carregamento (tampão 3x)

Sacarose 8 g
Azul de bromofenol 0,02 g
TE 20 ml
Brometo de etídeo 40 µl

ANEXO B – Tabela 4: Características morfológicas de acessos de *Capsicum baccatum* do Banco de Germoplasma do Instituto Federal Goiano – *Campus Ceres*. (Continua)

Acesso	Número de flores por axila	Posição da flor ¹	Cor da corola ³	Cor da mancha da corola ⁴	Estigma ⁵	Cor do fruto maduro ⁶	Forma do fruto ⁷	Forma do fruto conexão com pedicelo ⁸	Forma do ápice do fruto ⁹	Apêndice no ápice do fruto ¹⁰	Corrugação da seção transversal do fruto ¹¹	Número de lóculos ¹²	Persistência pedicelo fruto ¹³	Comp. do fruto ¹⁴	Largura do fruto ¹⁵	Espessura da parede do fruto ¹⁶	Peso médio de fruto ¹⁷
IFET 19	1	7	1	2	5	9	3	3	2	0	5	3	7	3	3	4	2
IFET 64	1	7	1	3	3	9	1	2	1	0	3	3	7	4	3	3	2
IFET 68	1	7	1	3	7	8	1	2	1	0	3	3	7	4	2	2	2
IFET 85	1	7	1	2	7	8	1	2	1	0	3	3	7	4	3	3	3
IFET 103	1	7	1	3	7	7	3	3	2	0	5	2	7	2	3	3	2
IFET 110	2	7	1	3	5	8	1	2	1	0	3	3	7	4	2	2	1
IFET 111	1	7	1	3	3	8	1	2	1	0	3	3	7	4	2	3	2
IFET 115	1	7	2	3	5	9	1	2	1	0	3	2	7	5	3	3	2
IFET 120	1	7	2	3	5	9	1	2	1	0	3	3	7	4	2	2	2
IFET 121	1	7	1	3	5	9	3	3	2	0	5	2	7	3	3	2	2
IFET 124	1	7	1	3	5	8	1	2	1	0	3	3	7	4	2	2	1
IFET 137	1	5	1	2	5	5	1	2	1	0	3	3	7	5	3	4	3
IFET 145	2	7	5	3	7	9	2		2	0	3		3	1	1	1	1
IFET 186	1	7	2	2	5	9	1	3	1	0	3	4	7	4	3	2	2
IFET 202	1	7	1	3	5	9	1	3	1	0	3	3	7	5	2	2	2
IFET 207	1	7	1	3	5	9	1	2	1	0	3	3	7	5	2	3	2
IFET 210	1	7	1	2	5	8	3	2	1	0	3	3	7	3	3	2	2
IFET 224	1	3	1	3	7	7	1	3	1	0	5	3	7	6	3	3	4
IFET 235	1	5	1	3	5	9	1	2	1	0	5	3	7	6	3	3	4
IFET 241	1	7	1	3	5	8	3	3	2	1	3	2	7	3	3	3	2
IFET 245	1	7	1	2	5	9	1	2	1	0	5	3	7	4	3	4	2
IFET 252	1	7	1	3	5	8	1	2	1	0	3	3	7	3	1	1	1
IFET 265	1	7	1	3	5	8	3	3	1	0	3	3	7	3	3	3	2
IFET 273	1	7	2	3	5	8	3	3	2	0	5	2	7	2	3	2	
IFET 289	1	7	1	3	5	9	1	3	1	0	5	3	7	4	3	2	2

Tabela 4: continuação

Acesso	Número de flores por axila	Posição da flor ¹	Cor da corola ²	Cor da mancha da corola ³	Estigma ⁴	Cor do fruto maduro ⁵	Forma do fruto ⁶	Forma do fruto conexão com pedicelo ⁷	Forma do ápice do fruto ⁸	Apêndice no ápice do fruto ⁹	Corrugação da seção transversal do fruto ¹⁰	Número de lóculos	Persistência pedicelo fruto ¹¹	Comp. do fruto ¹²	Largura do fruto ¹⁵	Espessura da parede do fruto ¹⁶	Peso médio de fruto ¹⁷
IFET 291	1	7	1	4	5	8	3	3	1	1	7	3	7	2	3	3	2
IFET 292	1	5	1	3	5	8	4	3	4	0	5	4	7	3	6	4	4
BRS Mari	1	7	2	3	5	8	1	2	1	0	3	3	7	4	2	2	2
Cambuci	1	5	1	3	5	7	4	3	4	0	5	4	7	3	6	4	4
Dedo-de-moça	1	7	2	3	5	8	1	2	1	0	3	2	7	3	2	2	2

¹ Posição da flor: 3 pendente; 5 intermediário; 7 ereta

² Cor da corola: 1 branca; 2 amarela clara; 5 púrpura com base branca.

³ Cor da mancha da corola: 2 amarela; verde amarelada.

⁴ Estigma: 3 inserto; 5 mesmo nível; 7 exserto.

⁵ Cor do fruto maduro: 5 laranja; 7 vermelha clara; 8 vermelho; 9 vermelho escuro.

⁶ Forma do fruto: 1 alongado; 2 arredondado; 3 triangular; 4 campanulado

⁷ Forma do fruto na conexão com pedicelo: 2 obtuso; 3 truncado

⁸ Forma do ápice do fruto: 1 pontudo; 2 arredondado; 4 fundido e pontudo

⁹ Apêndice no ápice do fruto: 0 ausente; 1 presente.

¹⁰ Corrugação transversal do fruto: 3 levemente corrugado; 5 intermediário; 7 muito corrugado.

¹¹ Persistência do pedicelo com o fruto: 3 fraca; 5 intermediária; 7 persistente.

¹² Comprimento do fruto: 1 (< 21 mm); 2 (21 a 40 mm); 3 (41 a 60 mm); 4 (61 a 80 mm); 5 (81 a 100 mm); 6 (> 100 mm).

¹³ Largura do fruto: 1 (< 9 mm); 2 (9 a 16 mm); 3 (17 a 24 mm); 4 (25 a 32 mm); 5 (33 a 40 mm); 6 (> 48 mm).

¹⁴ Espessura da parede do fruto: 1 (< 1,1); 2 (1,1 a 1,5 mm); 3 (1,6 a 2 mm); 4 (> 2 mm).

¹⁵ Peso médio do fruto: 1 (< 5 g); 2 (5 a 8 g); 3 (9 a 12 g); 4 (13 a 17 g).

ANEXO D – Tabela 6: Interpretação das bandas apresentadas pelos marcadores RAPD em caracterização molecular de *Capsicum baccatum*.

Amostra	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	342	669				
Primer	Acesso / bandas ladder	IFET 19	IFET 64	IFET 68	IFET 85	IFET 103	IFET 110	IFET 111	IFET 115	IFET 120	IFET 121	IFET 124	IFET 137	IFET 145	IFET 186	IFET 202	IFET 207	IFET 210	IFET 224	IFET 235	IFET 241	IFET 245	IFET 252	IFET 265	IFET 273	IFET 289	IFET 291	IFET 292	BRS Mari	Cambuci	Dedo-de-moça	CNPH 4266	CNPH 3773			
OP-F13	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
	800	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
OPN-7	1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
	900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	800	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	520	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1		
OPO-7	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	520	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	450	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
	300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
OPR-1	1600	1	1	0	1	1	1	1	-9	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1		
	1100	1	1	0	1	1	1	1	-9	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	
	1000	1	1	1	1	1	1	1	-9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	
	800	1	1	0	1	0	1	1	-9	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	750	1	1	0	1	0	1	1	-9	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	600	1	1	1	1	1	1	1	-9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
370	1	0	1	1	0	1	0	-9	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0		
POR-10	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	-9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	1950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	600	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	-9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	500	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	-9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
OP-R14	850	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
	530	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
OP-T55	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
	480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	

CNPH 4226: *C. frutescens*; CNPH 3773: *C. chinense*

ANEXO E – **Tabela 7:** Representação esquemática dos dados no delineamento em blocos completos casualizados aumentados (adaptado de NOGUEIRA e GOMES, 1978).

Tratamentos	Blocos			Total
	1	2	3	
BRS Mari	y ₁₁	y ₁₂	y ₁₃	t ₁
Cambuci	y ₂₁	y ₂₂	y ₂₃	t ₂
Dedo-de-moça	y ₃₁	y ₃₂	y ₃₃	t ₃
Total Blocos B'	$B'1 = \sum_{Y1,1, Y3,1}$	$B'2 = \sum_{Y1,2, Y3,2}$	$B'3 = \sum_{Y1,3, Y3,3}$	$T = \sum_{B'1, B'3}$
IFET 085	y ₄₁			
IFET 115	y ₅₁			
IFET 120	y ₆₁			
IFET 121	y ₇₁			
IFET 186	y ₈₁			
IFET 207	y ₉₁			
IFET 224	y ₁₀₁			
IFET 252	y ₁₁₁			
IFET 292	y ₁₂₁			
IFET 64		y ₄₂		
IFET 68		y ₅₂		
IFET 110		y ₆₂		
IFET 111		y ₇₂		
IFET 124		y ₈₂		
IFET 137		y ₉₂		
IFET 202		y ₁₀₂		
IFET 273		y ₁₁₂		
IFET 289		y ₁₂₂		
IFET 19			y ₄₃	
IFET 103			y ₅₃	
IFET 145			y ₆₃	
IFET 210			y ₇₃	
IFET 235			y ₈₃	
IFET 241			y ₉₃	
IFET 245			y ₁₀₃	
IFET 265			y ₁₁₃	
IFET 291			y ₁₂₃	
Total blocos B	$B1 = \sum_{y1,1, y12,1}$	$B2 = \sum_{y1,2, y12,2}$	$B3 = \sum_{y1,3, y12,3}$	$G = \sum_{B1,3}$

ANEXO F: **Tabela 8:** Esquema de análise de variância para o experimento, em blocos completos casualizados aumentados.

Fonte de variação	Graus de liberdade	SQ	QM	F
Blocos	2	$SQB = \frac{(B1^2 + \dots + B3^2)}{12} - \frac{G^2}{36}$		
Trat. ajustados	29	$SQtaj = SQT - SQB - SQR$	$SQtaj/29$	$QMtaj/QMR$
Resíduo	4	SQR^*	$QMR = SQR/4$	
Total	8	$SQT = \Sigma y^2 - \frac{G^2}{36}$		

*SQR: Estimado para blocos completos casualizados considerando-se apenas as testemunhas.

ANEXO G: Equação para ajuste de médias para blocos completos casualizados aumentados (NOGUEIRA e GOMES, 1978)

$$\bar{y}' = \bar{y} - \left(\frac{B'j}{t} - \frac{T}{c.b} \right) \quad (1)$$

Em que:

\bar{y}' : média ajustada para o acesso;

\bar{y} : média observada para o acesso;

$B'j$: Total do bloco j;

t: número de tratamentos testemunhas

T: $\Sigma B'$

b: número de blocos

ANEXO H: Diferença mínima significativa (DMS) para teste t para comparação de médias entre testemunhas (Equação 2), entre acessos de mesmo bloco (Equação 3), entre acessos de blocos diferentes (Equação 4) e entre acessos e tratamento testemunha (Equação 5).

$$DMS_{test} = t. \sqrt{2. \frac{QMR}{b}} \quad (2)$$

Em que:

DMStest: diferença mínima significativa entre os tratamentos testemunhas.

t: 2,78 - valor tabelado para 4 graus de liberdade do resíduo e 5% de probabilidade;

QMR: quadrado médio do resíduo para blocos completos casualizado

b: número de blocos

$$DMS_a = t. \sqrt{2. QMR} \quad (3)$$

Em que:

DMSa: Diferença mínima significativa entre acessos de um mesmo bloco;

t: 2,78 - valor tabelado para 4 graus de liberdade do resíduo e 5% de probabilidade;

QMR: quadrado médio do resíduo para blocos completos casualizado.

$$DMS_b = t. \sqrt{2. QMR(1 + \frac{1}{c})} \quad (4)$$

Em que:

DMSb: diferença mínima significativa entre acessos de blocos diferentes;

t: 2,78 - valor tabelado para 4 graus de liberdade do resíduo e 5% de probabilidade;

QMR: quadrado médio do resíduo para blocos completos casualizado;

c: número de tratamentos testemunhas.

$$DMS_c = t. \sqrt{QMR(1 + \frac{1}{c} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c.b})} \quad (5)$$

Em que:

DMSc: diferença mínima significativa entre acessos testemunhas e acessos;

t: 2,78 - valor tabelado para 4 graus de liberdade do resíduo e 5% de probabilidade;

QMR: quadrado médio do resíduo para blocos completos casualizado;

c: número de tratamentos testemunhas.

b: número de blocos

ANEXO I – Croqui experimental

Bloco I	Bloco II	Bloco III
IFET 120	'BRS Mari'	IFET 265
IFET 186	IFET 68	IFET 210
Cambuci	IFET 111	IFET 291
'BRS Mari'	dedo-de-moça	IFET 235
Dedo-de-moça	IFET 64	dedo-de-moça
IFET 207	IFET 202	IFET 241
IFET 252	Cambuci	IFET 145
IFET 85	IFET 124	IFET 19
IFET 224	IFET 289	'BRS Mari'
IFET 115	IFET 137	Cambuci
IFET 121	IFET 110	IFET 103
IFET 292	IFET 273	IFET 245

A) Croqui do experimento implantado em 29 de junho de 2012 para avaliação de incidência de viroses e antracnose em *Capsicum baccatum*.

BLOCO 1	BLOCO 2	BLOCO 3
IFET 224	IFET 202	IFET 64
IFET 210	IFET 103	IFET 235
IFET 110	IFET 19	Cambuci
Dedo-de-moça	IFET 68	IFET 252
IFET 273	IFET 121	'BRS Mari'
IFET 207	IFET 186	IFET 124
IFET 265	IFET 115	IFET 292
'BRS Mari'	Dedo-de-moça	IFET 120
IFET 291	'BRS Mari'	IFET 137
IFET 241	IFET 289	IFET 85
Cambuci	Cambuci	Dedo-de-moça
IFET 111	IFET 145	IFET 245

B) Croqui do experimento implantado em 16 de janeiro de 2013 para avaliação de incidência de viroses em *Capsicum baccatum*.

ANEXO J - Protocolo para realização do teste *Double antibody sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay* DAS-ELISA (CLARK e ADAMS, 1977)

- 1) 200 µl de IgG (1:1000) em tampão de revestimento; incubar por duas a seis horas a 37°C;
- 2) 100 µl de amostra preparada pela maceração de folhas em tampão PBS-TWEEN; incubar por duas horas a quatro horas a 37°C;
- 3) Adicionar 200 µl/poço do conjugado em tampão PBS-TWEEN, na diluição 1:1000; incubar *overnight* sob refrigeração, à 4°C;
- 4) Adicionar 100 µl de substrato fosfatase (0,71 mg mL⁻¹) em tampão de revelação e aguardar formação da coloração amarela nos controles positivos.
- 5) Efetuar leitura de absorbância em leitora de placa a 405 nm. O tempo para efetuar a leitura foi variável, sendo considerado resultado quando a leitura dos controles positivos atingiam valores entre 1 e 1,4.

Entre as etapas efetuar a lavagem das placas com PBS-TWEEN por três vezes, deixando os poços por três minutos com o tampão a cada lavagem.

ANEXO K – Soluções utilizadas no DAS-ELISA

Tampão de revestimento (pH 9,3)

1,5 g L⁻¹ Na₂CO₃
2,93 g L⁻¹ NaHCO₃
0,2 g L⁻¹ NaN₃

Tampão PBS 10X (pH 7,4)

81,1 g L⁻¹ NaCl
2,0 g L⁻¹ KH₂PO₄
29,0 g L⁻¹ Na₂HPO₄ 12 H₂O
2,0 g L⁻¹ KCl

PBS –TWEEN

0,5 mL Tween
0,1 L PBS 10x
0,9 L H₂O)

Tampão de revelação (pH 9,8)

96 mL L⁻¹ Dietanolamina

ANEXO M – Figura 15: Exemplos de acessos de *Capsicum baccatum* estudados

