

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Caracterização e seleção de linhagens avançadas de
pimenta do grupo Habanero (*Capsicum chinense*) para
lançamento como novas cultivares**

Renato Silva Soares

Engenheiro Agrônomo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Caracterização e seleção de linhagens avançadas de
pimenta do grupo Habanero (*Capsicum chinense*) para
lançamento como novas cultivares**

Renato Silva Soares

Orientadora: Profa. Dra. Leila Trevisan Braz

Coorientadores: Dr. Francisco J. B. Reifschneider

Dra. Cláudia da Silva C. Ribeiro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Produção Vegetal).

S676c Soares, Renato Silva
Caracterização e seleção de linhagens avançadas de pimenta do grupo Habanero (*Capsicum chinense*) para lançamento como novas cultivares / Renato Silva Soares. -- Jaboticabal, 2020
183 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Leila Trevisan Braz
Coorientador: Francisco José Becker Reifschneider

1. Diversidade genética. 2. Fitopatogogia. 3. Morfologia de plantas. 4. Cultivares. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE LINHAGENS AVANÇADAS DE PIMENTA DO GRUPO HABANERO (*Capsicum chinense*) PARA LANÇAMENTO COMO NOVAS CULTIVARES

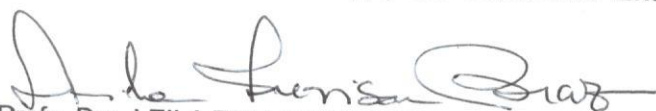
AUTOR: RENATO SILVA SOARES

ORIENTADORA: LEILA TREVISAN BRAZ

COORIENTADORA: CLÁUDIA SILVA DA COSTA RIBEIRO

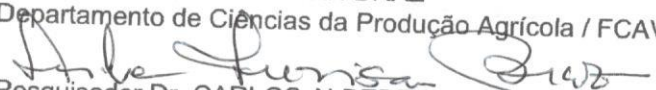
COORIENTADOR: FRANCISCO JOSÉ BECKER REIFSCHNEIDER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



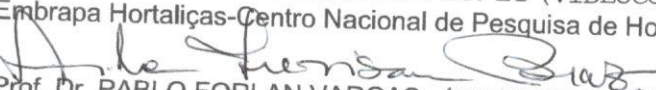
Profa. Dra. LEILA TREVISAN BRAZ

Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV / UNESP - Jaboticabal



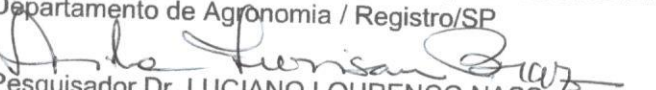
Pesquisador Dr. CARLOS ALBERTO LOPES (VIDEOCONFERÊNCIA)

Embrapa Hortaliças-Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças / Brasília/DF



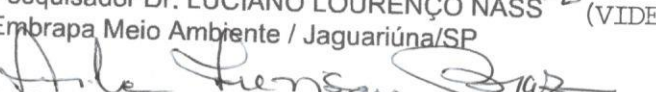
Pf Prof. Dr. PABLO FORLAN VARGAS (VIDEOCONFERÊNCIA)

Departamento de Agronomia / Registro/SP



Pf Pesquisador Dr. LUCIANO LOURENÇO NASS (VIDEOCONFERÊNCIA)

Embrapa Meio Ambiente / Jaguariúna/SP



Pf Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN (VIDEOCONFERÊNCIA)

Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de maio de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENATO SILVA SOARES - nasceu em 05 de setembro de 1991, na cidade de Itapuranga – GO. Filho de José de Almeida Soares e Ivanda Maria da Silva Soares, formou-se técnico em agropecuária pelo Instituto Federal Goiano – Câmpus Ceres, em 2009. Em 2010, ingressou no curso de Agronomia pela mesma instituição. No decorrer da graduação, foi bolsista de iniciação científica PIBITI/CNPq (2010/2011), PIBITI/IFGoiano (2011/2013) e PIVIC/IFGoiano (2013/2014), participando do projeto “Melhoramento genético de pimentas *Capsicum* adaptadas às condições edafoclimáticas do centro e norte Goiano” com a colaboração da Embrapa Hortaliças. Também participou de pesquisas na área de produção e tecnologia de sementes, na mesma instituição. Em 2014, realizou estágio curricular na Embrapa Hortaliças, onde participou de atividades ligadas ao melhoramento genético de *Capsicum* spp., sob orientação dos pesquisadores Dr. Francisco José Becker Reifschneider e Dra. Cláudia Silva da Costa Ribeiro. Em março de 2015 ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal-SP. Foi bolsista CAPES, trabalhando com melhoramento genético para resistência a pragas e doenças, com enfoque na cultura do pimentão, e obteve o título de mestre em fevereiro de 2017. Em março de 2017 ingressou no curso de doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) pela mesma instituição, com bolsa da Capes. De janeiro de 2018 a fevereiro de 2020 realizou estágio doutoral na Embrapa Hortaliças, onde desenvolveu seu trabalho de tese direcionado às áreas de melhoramento genético, fitopatologia, biologia molecular e registro e proteção de cultivares.

Aos meus pais, José de Almeida Soares e Ivanda Maria da Silva Soares, que nunca mediram esforços para que todos os meus anseios pudessem ser alcançados.

DEDICO

Aos meus queridos irmãos Franciele da Silva Soares e Douglas da Silva Soares, pelo apoio constante e por estarem sempre presentes, mesmo a distância, em minha vida.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar minha vida, dando discernimento para enfrentar e superar as dificuldades.

Aos meus pais, José de Almeida Soares e Ivanda Maria da Silva Soares, pelo exemplo de luta, determinação e companheirismo, e por sempre estarem presentes em minha vida.

Aos meus irmãos Douglas da Silva Soares e Franciele da Silva Soares, pelo apoio e carinho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em especial ao programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), pela oportunidade concedida para a realização do curso em nível de doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Profa. Dra. Leila Trevisan Braz, pela orientação, apoio, ensinamentos e incentivo.

Aos coorientadores Dr. Francisco José Becker Reifschneider e Dra. Cláudia da Silva Costa Ribeiro pelas orientações, disponibilidade, dedicação, amizade, paciência, e principalmente pelos conselhos. Meu agradecimento especial ao Dr. Francisco Reifschneider, exemplo de dedicação à pesquisa, por todas as oportunidades que me proporcionou, as quais foram importantes para que eu pudesse alimentar a confiança em mim mesmo. Sem o seu apoio, nada disso seria possível.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), que muito contribuíram para minha formação, em especial: Dra. Leila Trevisan Braz, Dr. Antonio de Goes, Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos, Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves e Dr. Rouverson Pereira da Silva.

Aos pesquisadores da Embrapa Hortaliças: Dra. Sabrina Isabel Carvalho, Dr. Carlos Alberto Lopes, Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata, Dra. Alice

Maria Quezado Duval, Dr. Ailton Reis e Me. Carlos Ragassi pelas sugestões e todo o apoio recebido durante a realização desse trabalho.

Aos colegas e funcionários da Embrapa Hortaliça, em especial, Athayde Garcia, Deusimar Lima, Jacinto Pereira, José Getúlio da Silva Filho, Lúcio, Deusanio e Ricardo, pelo auxílio na condução dos trabalhos de campo e de laboratório.

À equipe do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Dra. Gláucia Buso, Dr. Marcio Moretzsohn, Dra. Marília Pappas, Zilneide, Lorena e Peter, pelas orientações, sugestões e pela agradável convivência.

Aos funcionários do Setor de Olericultura e Plantas Aromático-Medicinais da FCAV/UNESP, Inauro, Reinaldo e Cláudio.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) da FCAV/UNESP: Rosane, Sidnéia e Wagner.

Aos amigos da República TOcaFogo: Adão Felipe, Everton Carvalho, Antônio Tássio, Emmanuel Pereira e Anderson pelos momentos de alegria e descontração.

.Aos amigos da Embrapa Hortaliças e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Carlos Ragassi, Gabriel Emiliano, Juliana Zucolotto, Wellington, Jorge, Nayara, por toda ajuda tanto nos experimentos, quanto na caminhada da Pós-Graduação.

Aos amigos do grupo do Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento – NEOM, pelos momentos de trabalho e descontração vividos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 O gênero <i>Capsicum</i>	5
2.1.1 Origem, domesticação e dispersão.....	5
2.1.2 Taxonomia e botânica	6
2.1.3 <i>Capsicum chinense</i>	10
2.2 Importância socioeconômica.....	11
2.2.1 Mercado de pimentas	11
2.2.2 Informações nutricionais e farmacológicas	12
2.2.3 Dados econômicos	13
2.3 Melhoramento genético de <i>Capsicum</i>	15
2.3.1 Recursos genéticos	15
2.3.2 Principais programas de melhoramento no Brasil.....	16
2.3.3 Melhoramento de pimenta Habanero.....	18
2.3.3.1 Pimenta Habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.).....	18
2.3.3.2 Programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças.....	19
2.3.3.3 População base	20
2.4 Registro e proteção de cultivares.....	23
2.4.1 Conceitos	23
2.4.2 Importância do registro e proteção de cultivares.....	26
2.4.3 Requisitos para registro e proteção de cultivares	29
2.4.4 Teste de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE)	31
2.4.5 Testes adicionais.....	33
2.4.5.1 Marcadores moleculares	33
2.4.5.2 Resistência a doenças	34
3. REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 2 - VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO BASE DE PIMENTA HABANERO COM BASE EM CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E MARCADORES SSR	51
RESUMO	51
ABSTRACT	52
1 INTRODUÇÃO	54
2 MATERIAL E MÉTODOS	56

2.1 Material e local.....	56
2.2 Caracterização morfológica	58
2.3 Caracterização molecular	59
2.4 Análise estatística.....	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4 CONCLUSÃO.....	74
5 REFERÊNCIAS	74
CAPÍTULO 3 - REAÇÃO DE LINHAGENS AVANÇADAS DE PIMENTA HABANERO ÀS PRINCIPAIS DOENÇAS	81
RESUMO	81
ABSTRACT	82
1 INTRODUÇÃO	83
2 MATERIAL E MÉTODOS	87
2.1 Genótipos e patógenos.....	87
2.2 <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	88
2.3 <i>Phytophthora capsici</i>	89
2.4 <i>Meloidogyne</i> (<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> e <i>M. enterolobii</i>)	90
2.5 <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	93
2.6 <i>Potato virus Y</i> (PVY); <i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV) e <i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV)	94
2.7 Análise estatística.....	95
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 Reação a <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	96
3.2 Reação a <i>Phytophthora capsici</i>	99
3.3 Reação a <i>Meloidogyne</i> (<i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> raça 1 e <i>M. enterolobii</i>) ..	102
3.4 Reação a <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	105
3.5 Reação a <i>Potato virus Y</i> (PVY); <i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV) e <i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV)	107
4 CONCLUSÃO.....	110
5 REFERÊNCIAS	113
CAPÍTULO 4 - NOVAS LINHAGENS BRASILEIRAS DE PIMENTA HABANERO (<i>Capsicum chinense</i>): CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E BIOQUÍMICA EM DIFERENTES AMBIENTES	123
RESUMO	123
ABSTRACT	124
1 INTRODUÇÃO	125
2 MATERIAL E MÉTODOS	127
2.1 Material e delineamento experimental	127
2.2 Caracterização morfoagronômica	129

2.3 Caracterização físico-química.....	130
2.3.1 Parâmetros colorimétricos Luminosidade - (L*), Cromaticidade (C*) e ângulo hue (°hue)	130
2.3.2 pH e acidez total titulável (AT)	130
2.3.3 Sólidos solúveis totais (SST)	131
2.3.4 Vitamina C total	131
2.3.5 Determinação do teor de capsaicinóides	131
2.3.6 Análise de carotenóides	131
2.4 Análises estatísticas	132
3 RESULTADOS	132
3.1 Caracterização morfoagronômica	132
3.2 Caracterização físico-química.....	136
4 DISCUSSÃO	139
4.1 Caracterização morfoagronômica	139
4.2 Caracterização físico-química.....	142
5 CONCLUSÃO.....	146
6 REFERÊNCIAS.....	146
CAPÍTULO 5 - TESTE DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE (DHE) PARA NOVAS LINHAGENS ENDOGÂMICAS DE PIMENTA HABANERO CANDIDATAS A PROTEÇÃO DE CULTIVARES.....	155
RESUMO	155
ABSTRACT	156
1 INTRODUÇÃO	157
2 MATERIAL E MÉTODOS	159
2.1 Material genético e delineamento experimental	159
2.2 Ensaios de DHE: Caracterização morfológica	160
2.3 Análise molecular	164
2.4 Análise estatística.....	165
3 RESULTADOS	166
4 DISCUSSÃO	173
5 CONCLUSÃO.....	177
6 REFERÊNCIAS.....	178
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	184

Caracterização e seleção de linhagens avançadas de pimenta do grupo Habanero (*Capsicum chinense*) para lançamento como novas cultivares

RESUMO

A pimenta denominada Habanero constitui um grupo, dentro da espécie *C. chinense*, com elevada diversidade quanto às características relacionadas à parte vegetativa, folhas, flores e, principalmente, frutos. Além disso, a pimenta do grupo Habanero apresenta importantes compostos bioquímicos, benéficos para saúde humana. Atualmente, observa-se uma alta demanda por esse tipo de pimenta pelo mercado nacional e também internacional. No entanto, poucas cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas e com resistência aos principais patógenos estão disponíveis no Brasil. Visando explorar a diversidade da pimenta Habanero e disponibilizar novas cultivares ao mercado nacional, a Embrapa Hortaliças iniciou um programa de melhoramento genético que desenvolveu uma população base de pimenta Habanero de ampla variabilidade genética, a partir de intercruzamentos de acessos contrastantes morfológicamente e posteriores ciclos de seleção. A partir desse programa de melhoramento foi possível obter três linhagens endogâmicas. Para assegurar o direito de propriedade intelectual aos melhoristas e disponibilizar as novas cultivares ao produtor é necessária a comprovação de novidade, distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade a partir de ensaios de DHE, seguindo as normas do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (SNPC/MAPA). Assim, a presente tese objetivou: **1)** avaliar a variabilidade genética presente na população base, bem como nos acessos genitores de pimenta Habanero, por meio de descritores morfológicos e marcadores microssatélites; **2)** avaliar a reação de linhagens avançadas de pimenta Habanero aos patógenos: *Ralstonia pseudosolanacearum* (Rp), *Phytophthora capsici* (Pc), *Meloidogyne* (*M. incognita* raça 1- Mi, *M. javanica* – Mj e *M. enterolobii* – Me), *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe) e os vírus *Potato virus Y* (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV); **3)** caracterizar morfoagronômica e físico-bioquimicamente novas linhagens de pimenta Habanero cultivadas em diferentes ambientes e investigar a interação genótipo x ambiente, visando fornecer subsídios para o processo de registro de novas cultivares e posterior lançamento e **4)** caracterizar as linhagens endogâmicas avançadas através do teste de DHE, bem como através de marcadores microssatélites visando obter informações para o processo de proteção e lançamento de novas cultivares. Para o estudo da variabilidade genética, 30 acessos genitores e 144 plantas da população base foram avaliados quanto a 45 descritores morfológicos e 26 *primers* microssatélites. A variabilidade genética foi estimada através das matrizes de distâncias genéticas. As análises de agrupamento foram realizadas por meio de dendrogramas, utilizando-se como critério de agrupamento o método UPGMA. As linhagens avançadas CNPH 15.737, CNPH 15.740, CNPH 15.744, CNPH 15.745, CNPH 15.749 e CNPH 15.750 foram inoculadas com três isolados de Rp e um isolado de cada um dos seguintes patógenos: Pc, Mi, Mj, Me, Xe, PVY, PepYMV e PMMoV. Foram avaliados a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e incidência para Pc, Rp, Xe, PVY, PepYMV e PMMoV; índice de severidade

para Rp e Xe e os parâmetros nematológicos: índice de massa de ovo (IMO), índice de galhas (IG), número total de ovos e juvenis (NTOJ), fator de reprodução (FR) e índice de reprodução (IR) para as espécies de nematoides de galhas. Para a caracterização morfoagronômica e físico-bioquímica, três linhagens avançadas (CNPH 15.740, CNPH 15.744 e CNPH 15.749) e duas cultivares comerciais testemunhas (BRS Nandaia e BRS Juruti) foram cultivadas em três diferentes ambientes, dois em campo aberto e um em ambiente protegido. A caracterização baseou-se em nove caracteres morfoagronômicos, oito físico-bioquímicos e incidência das cinco principais viroses em plantas cultivadas em campo aberto. Por fim, as linhagens CNPH 15.740; CNPH 15.744 e CNPH 15.749 e as testemunhas CNPH 4215, CNPH 4159, BRS Juruti e BRS Nandaia foram avaliadas em dois testes de DHE (2018 e 2019) utilizando 48 descritores morfológicos multicategóricos e 11 *primers* microssatélites. Foi observada elevada variabilidade genética entre os acessos genitores e entre as plantas da população base através dos descritores morfológicos e marcadores SSR, representando uma importante fonte de recursos genéticos para o atual e também para os futuros programas de melhoramento genético de pimenta Habanero da Embrapa Hortaliças. CNPH 15.737 e CNPH 15.740 mostraram-se altamente resistente aos isolados de Rp, a PVY e a Mj. As linhagens também apresentaram nível moderado de resistência a Pc e a Mi pelo índice de reprodução. CNPH 15.749 apresentou alta resistência a PVY, Mj e resistência moderada ao isolado de Pc e a Me. Pelo índice de reprodução, a linhagem CNPH 15.749 mostrou – se resistente a Mi. CNPH 15.744 apresentou resistência a Mi. CNPH 15.750 foi considerada moderadamente resistente a Xe. As três novas linhagens apresentaram características importantes e desejáveis, como alta produtividade, tamanho adequado de plantas (100.0–150.0 cm) e qualidade superior de frutos em ambiente protegido (CNPH 15.744); potencial de cultivo em campo aberto com alto rendimento (35.0 a 40.0 t ha⁻¹; CNPH 15.749 e CNPH 15.740) e superioridade nas características dos frutos, menor acidez titulável total (15–22%) e ausência *Potato virus Y* (CNPH 15.740). As linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.744 foram distintas entre si e entre as testemunhas para os parâmetros morfológicos, agronômicos e marcadores microssatélites, bem como homogêneas e estáveis nos dois ensaios de DHE. As linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.744 são candidatas promissoras ao processo de proteção de cultivares, bem como apresentam potencial para serem lançadas como novas cultivares para o mercado brasileiro de pimentas.

Palavras-chave: Diversidade, patógenos, testes de DHE, registro e proteção de cultivares.

Characterization and selection of advanced lines of Habanero pepper (*Capsicum chinense*) for releasing as new cultivars

ABSTRACT

The Habanero peppers compose a group, within the species *C. chinense*, that present high morphological variability. In addition, the Habanero pepper has important biochemical compounds, beneficial for human health. Currently, there is a high demand for this type of pepper in the national and international markets. However, there are few cultivars adapted to Brazilian climatic conditions as well as resistant to major pathogens. In order to explore the diversity of Habanero peppers and release new cultivars to the national market, Embrapa Hortaliças developed a breeding program (from intercrosses of contrasting accessions and subsequent selection cycles) aiming to establish a base population with wide genetic variability. Through this breeding program, it was possible to obtain three inbred lines. In order to ensure the intellectual property rights to the breeders and to release the new cultivars, it is necessary to prove novelty, distinctiveness, uniformity and stability based on DUS tests, following the norms of the National Plant Variety Protection Service of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (SNPC / MAPA). The objectives of this thesis were: **1)** to evaluate the genetic variability present in the *C. chinense* Habanero base population, as well as in its parental accessions, through morphological descriptors and microsatellite markers; **2)** to evaluate advanced lines of Habanero pepper reaction to the following main pathogens: *Ralstonia pseudosolanacearum* (Rp), *Phytophthora capsici* (Pc), *M. incognita* - Mi, *M. javanica* - Mj and *M. enterolobii* - Me, *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe); *Potato virus Y* (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) and *Pepper mild mottle virus* (PMMoV); **3)** to carry out a morpho-agronomic and biochemical characterization of new lines cultivated in different environments, and to investigate the genotype x environment interaction, aiming to provide subsidies for the registration process of the new cultivars, and their subsequent release; **4)** to characterize phenotypic and genotypically the three advanced inbred lines through the DUS test, as well as microsatellite markers in order to obtain information for the process of protection and release of new cultivars. In the study of genetic variability, 30 parental accessions and 144 plants from the base population were evaluated for 45 morphological descriptors and 26 microsatellite primers. The genetic variability was estimated through the matrices of genetic distances. Cluster analyzes were performed using UPGMA method. CNPH 15.737; CNPH 15.740; CNPH 15.744; CNPH 15.745; CNPH 15.749 and CNPH 15.750 were inoculated with three RP isolates and one isolate from each of the following pathogens: Pc, Mi, Mj, Me, Xe, PVY, PepYMV and PMMoV. The area under the disease progress curve and incidence were obtained for Pc, Rp, Xe, PVY, PepYMV e PMMoV; severity index for Rp and Xe and the nematological parameters egg mass index (IMO), gall index (IG), total number of eggs and juveniles (NTOJ), reproduction factor (FR) and reproduction index (IR) for root knot nematodes species. In morpho-agronomic and biochemical characterization, three advanced lines (CNPH 15.740; CNPH

15.744 and CNPH 15.749) and two commercial check cultivars (BRS Nandaia and BRS Juruti) were grown in three different environments, two in open fields and one in a protected environment. The characterization of the lines was based on nine morpho-agronomic and nine biochemical descriptors; field-incidence of the five main virus diseases was also evaluated. Finally, CNPH 15.740; CNPH 15.744 and CNPH 15.749 lines, CNPH 4215, CNPH 4159, BRS Juruti and BRS Nandaia were evaluated in two DUS tests (2018 and 2019) using 48 multi-categorical morphological descriptors and 11 microsatellite primers. High genetic variability was observed between parental accesses and between plants of the base population through morphological descriptors and SSR markers, representing an important source of genetic resources for the current and future Habanero pepper breeding programs. CNPH 15.737 and CNPH 15.740 presented high resistance to Rp, PVY and Mj isolates. The lines also showed moderate level of resistance to Pc and Mi. CNPH 15.749 presented high resistance to PVY, Mj and moderate resistance to Pc isolate and Me. CNPH 15.749 was very resistant to Mi as indicated by the reproduction index. CNPH 15.744 showed resistance to Mi. CNPH 15.750 was moderately resistant to Xe. The three new lines presented important and desirable characteristics such as high yield, adequate plant size (100.0–150.0 cm) and superior quality of fruits in protected environment (CNPH 15.744); open field cultivation potential with high yield (35.0 to 40.0 t ha⁻¹; CNPH 15.749 and CNPH 15.740); and superiority for fruit characteristics, lower total titratable acidity (15–22%) and absence of *Potato Virus Y* (CNPH 15.740). CNPH 15.740 and CNPH 15.744 were distinct for the morphological, agronomic and microsatellite markers parameters, as well as homogeneous and stable in the two DUS tests. CNPH 15.740 and CNPH 15.744 presented the potential to be submitted to the cultivar registration process and to be released as new Habanero pepper cultivars developed in and adapted to Brazil.

Keywords: diversity, pathogens, DUS tests, registry, cultivar protection.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

As pimentas (*Capsicum* spp.) representam a principal especiaria originária do continente americano (LUTZ, 2008), sendo cultivadas atualmente nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (WAHYUNI et al., 2013). Os frutos de pimenta podem ser classificados como “doce” ou pungentes e são consumidos frescos ou ainda transformados em vários subprodutos, por exemplo, pastas, molhos, pápricas, flocos, entre outros (MEDINA-LARA et al., 2008).

O gênero *Capsicum* compreende um grupo altamente diversificado (REIFSCHNEIDER, 2000). Várias espécies deste gênero foram descritas, no entanto, apenas cinco são domesticadas e amplamente difundidas comercialmente: *C. annuum* L. var. *annuum*; *C. frutescens* L.; *C. baccatum* var. *pendulum* (Wild.) Eshbaugh; *C. pubescens* L. e *C. chinense* Jacquin (KIM et al., 2014).

Capsicum chinense Jacquin tem como centro de diversidade a Bacia Amazônica, sendo considerada a mais brasileira das espécies domesticadas (POZZOBON et al., 2015). Dentre os diversos tipos varietais presentes na espécie, destacam-se as pimentas de-cheiro, bode, cumari-do-Pará, biquinho e Habanero (REIFSCHNEIDER et al., 2015).

A pimenta do tipo Habanero é ingrediente fundamental na culinária de vários países da América Latina (NASS et al., 2015) e vem conquistando novos mercados de molhos e pastas (*mash*) picantes principalmente em países da Europa e Ásia (TEODORO et al., 2013). A sua demanda crescente explica-se pelo sabor e aroma únicos (RODRIGUEZ-BURRUEZO et al., 2010), elevada pungência (BOSLAND & COON, 2015) e presença de importantes compostos nutracêuticos em seus frutos (TEODORO et al., 2013, GIUFFRIDA et al., 2013, CASTRO-CONCHA et al., 2014, JEEATID et al., 2018). No entanto, observam-se poucas cultivares de pimenta Habanero disponíveis no mercado brasileiro com atributos que atendam as necessidades do produtor, indústria

processadora e preferências do consumidor. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas cultivares com elevada qualidade de frutos, resistência aos principais patógenos e adaptadas às condições de cultivo.

A Embrapa Hortaliças desenvolve programas de melhoramento de pimentas do gênero *Capsicum* há mais de três décadas, cujo pilar se deve à variabilidade genética mantida no Banco Ativo de Germoplasma (BAG), atualmente com mais de 4.000 entradas de diversas espécies que compõem o gênero (NASS et al., 2015). O sucesso do programa de melhoramento se evidencia pelo lançamento de cultivares amplamente adotadas por produtores nacionais, tais como as primeiras cultivares brasileiras de Habanero, BRS Juruti e BRS Nandaia.

Mais recentemente, foi adotada nova estratégia para o fortalecimento do programa de melhoramento por meio do estabelecimento de uma inédita população base de pimenta Habanero. Trinta e um acessos do tipo Habanero, contrastantes morfológicamente, foram cruzados entre si para o desenvolvimento da população base (NASS et al., 2015). Esta população apresenta elevada variabilidade, resultante de possíveis recombinações genéticas decorrente dos intercrossamentos entre os genitores. A alta variabilidade dessa população base permite selecionar genótipos superiores com características promissoras para a condução de programas de melhoramento genético e, conseqüentemente, o lançamento de novas cultivares que atendam a demanda de mercado. Plantas da população base, com características distintas, foram selecionadas e avançadas por cinco gerações de autofecundação e seleção de plantas individuais com teste de progênie, dando origem a seis novas linhagens com características promissoras.

Para que as linhagens sejam disponibilizadas como novas cultivares, precisam ser avaliadas em ensaios de validação, registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e submetidas ao processo de proteção de cultivares, que no Brasil é regido pela Lei nº 9.456, denominada Lei de Proteção de Cultivares (LPC).

A LPC vigora no país desde 1997 de forma a garantir o direito de propriedade intelectual aos melhoristas de plantas (CARVALHO et al. 2009; AVIANI & MACHADO, 2015). Para a obtenção do certificado de proteção de cultivares junto ao Serviço de Proteção de Cultivares (SNPC) do MAPA, é necessário comprovar as características de novidade, clara distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade e denominação própria da cultivar candidata à proteção (SANTOS et al., 2012). Esta comprovação é realizada por meio de testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE).

Para o gênero *Capsicum*, os testes de DHE seguem as normas do Ato n.º 2 de 22 de março de 2006, que estabelece o uso de descritores morfológicos multicategóricos, incluindo caracteres qualitativos e quantitativos, avaliados em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (PIMENTA et al., 2016). Outros descritores e/ou ferramentas também podem ser acrescentados ao formulário de solicitação da proteção. Exemplos de testes complementares ao ensaio de DHE são: avaliações de características morfoagronômicas e valor nutricional, resistência a pragas e doenças, e uso de marcadores moleculares (MACHADO, 2011).

No gênero *Capsicum* são relatados diversos agentes patogênicos que afetam diretamente as pimenteiras. Dentre os patógenos que atacam as pimentas, destacam-se aqueles que são associados ao solo, como *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* sp. nov (GRANKE et al. 2012; ROSSATO et al. 2018), *Phytophthora capsici* Leonian (SÁNCHEZ-CHÁVEZ et al. 2017), e os nematoides do gênero *Meloidogyne* (PINHEIRO et al. 2014). Fitoparasitas associados à parte aérea também são relatados causando sérios danos à cultura, os quais incluem várias espécies de vírus e bactérias, como por exemplo, os vírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) (JANZAC et al., 2009; SCHOLTHOF et al., 2011; ÖZKAYNAK et al., 2014) e as bactérias do gênero *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria* e *X. gardneri*) (ROACH et al., 2018).

As técnicas moleculares são utilizadas com sucesso para estimar a diversidade genética de uma população, na comprovação da origem genética de uma cultivar, na identificação de cultivares em casos de uso indevido de germoplasma e na distinção entre cultivares (AVIANI & SANTOS, 2011). Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, os SSR (*Single Sequence Repeat*) são amplamente aplicáveis devido à sua alta reprodutibilidade, por serem codominantes e multialélicos, e ainda representarem tipos de variações altamente polimórficas (TOPPA & JADOSKI, 2013; BUSO et al., 2016).

Diante do exposto, com o presente trabalho objetivou-se: a) avaliar a variabilidade genética presente na população base, bem como nos acessos genitores de pimenta Habanero, por meio de descritores morfológicos e marcadores microssatélites; b) avaliar a reação de linhagens avançadas de pimenta do grupo Habanero às principais doenças; c) caracterizar morfoagronômica e bioquimicamente as novas linhagens de pimenta Habanero, cultivadas em diferentes ambientes e investigar a interação genótipo x ambiente, buscando fornecer subsídios para o processo de registro de novas cultivares e posterior lançamento e d) caracterizar fenotípica e genotipicamente linhagens de pimenta Habanero por meio de testes de DHE, bem como através de marcadores microssatélites visando efetuar o pedido de proteção de cultivar junto ao SNPC/MAPA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Capsicum*

2.1.1. Origem, domesticação e dispersão

A importância das pimentas como planta cultivada iniciou-se na América há milhares de anos. Os primeiros registros arqueológicos de *Capsicum* foram descobertos em cavernas da região de Guitarrero e Pachamachay, no Peru e datam de 8.000 a 8.600 anos a.C. (REIFSCHNEIDER et al., 2015). Acredita-se que os povos nativos, que ali viviam, utilizavam as pimentas na alimentação e como plantas detentoras de poderes místicos e espirituais (BOSLAND, 1999; PADILHA & BARBIERI, 2016).

O gênero *Capsicum* tem como centro de origem a Bolívia Sul-Central, possuindo como ancestral comum à espécie *C. chacoense* (MOSCONE et al., 2007). Através das correntes dos rios e a ação das aves migratórias, houve a dispersão das pimentas para os Andes e região Amazônica (REIFSCHNEIDER, 2000).

No Brasil, antes do descobrimento, tribos indígenas faziam uso da pimenta para realçar o sabor dos alimentos e preservá-los, além de servir como remédio para várias enfermidades, rituais religiosos, e ainda como arma contra seus inimigos (CHIOU et al., 2014; REIFSCHNEIDER et al., 2015).

Com a chegada dos colonizadores europeus ao continente Americano, no final do século XV, houve o início de forte intercâmbio de plantas cultivadas entre o Novo e o Velho Mundo. Plantas nativas que eram utilizadas por comunidades indígenas, foram dispersas mundialmente, dentre estas, se destacam as pimentas do gênero *Capsicum* (ANDREWS, 1984, BOSLAND & VOTAVA, 2000). Reifschneider & Ribeiro (2008) relatam que os espanhóis, assim como os navegadores portugueses foram os principais dispersores das pimentas, devido ao valor condimentar de seus frutos, além de suas propriedades medicinais e uso ornamental. Atualmente, cultivam-se pimentas em praticamente todo o mundo, destacando as regiões de clima tropical e temperado (HILL et al., 2013).

2.1.2. Taxonomia e botânica

Capsicum L. é o gênero botânico que abrange os pimentões, pimentas domesticadas e semidomesticadas e seus parentais silvestres. De acordo com o sistema de classificação de Cronquist (1981) o gênero pertence à Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteriadae, Ordem Solanales, Família Solanaceae, subfamília Solanoideae, tribo Solaneae e subtribo Capsicinae. O nome *Capsicum* está relacionado a dois significados etimológicos, ligados as características de frutos. Nuez et al. (1996), relatam que o termo deriva do grego *Kapso*, que significa “morder”, “picar”, e está atribuído ao ardor provocado pelo consumo de frutos. Para Thomaz (1999) consta que a palavra vem do latim *capsa*, adaptação do grego *κάψα*, significando “caixa”, referindo-se à forma do fruto oco, semelhante a uma cápsula ou pequena caixa. No entanto, para Nuez et al. (1996) a palavra pimenta é derivada do latim *pigmenta*, plural de *pigmentum*, que significa corante.

O gênero *Capsicum* é composto por cerca de 35 *taxa*, incluindo as espécies e algumas variedades botânicas, sendo cinco domesticadas, apresentando importância comercial, 10 semidomesticadas e 20 silvestres (REIFSCHNEIDER, 2000; BARBOZA & BIANCHETTI, 2005; DeWITT & BOSLAND, 2009) (Tabela 1).

O Brasil possui o maior número de espécies silvestres de *Capsicum*, sendo a região sudeste o principal centro de diversidade. Foram registradas cerca de 12 *taxa* no território nacional, frequentemente encontradas nas áreas de Mata Atlântica (REIFSCHNEIDER et al., 2015).

Os recursos genéticos silvestres de diferentes espécies botânicas têm sido amplamente utilizados em programas de pré-melhoramento, devido à alta variabilidade encontrada nestas espécies. Segundo Nass & Sigrist (2009) uma vez que plantas silvestres coevoluíram com pragas e patógenos em diversos ambientes, estes materiais frequentemente apresentam genes de resistência e adaptação ainda inexplorados.

Tabela 1. Relação de espécies e variedades de *Capsicum*, conforme categoria de domesticação.

Domesticadas	Semidomesticadas	Silvestres
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	<i>C. campylopodium</i>
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i>	<i>C. buforum</i>
<i>C. chinense</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	<i>C. dusenii</i>
<i>C. frutescens</i>	<i>C. chinense</i> (forma silvestre)	<i>C. flexuosum</i>
<i>C. pubescens</i>	<i>C. frutescens</i> (forma silvestre)	<i>C. friburgense</i>
	<i>C. eximium</i>	<i>C. hunzikerianum</i>
	<i>C. galapagoense</i>	<i>C. mirabile</i>
	<i>C. cardenassi</i>	<i>C. parvifolium</i>
	<i>C. tovari</i>	<i>C. pereirae</i>
	<i>C. chacoense</i>	<i>C. vilosum</i>
		<i>C. chacoense</i> var. <i>tomentosum</i>
		<i>C. ciliatum</i>
		<i>C. coccineum</i>
		<i>C. cornutum</i>
		<i>C. dimorphum</i>
		<i>C. geminifolium</i>
		<i>C. hookerianum</i>
		<i>C. lanceolatum</i>
		<i>C. minutiflorum</i>
		<i>C. shottianum</i>
		<i>C. scolnikianum</i>

Fontes: Reifschneider (2000), Barboza & Bianchetti (2005), Carvalho & Bianchetti (2008).

As espécies e variedades ditas domesticadas são aquelas que passaram por processo de transformação ou alteração genética durante a evolução (MEYER & PURUGGANAN, 2013; CARVALHO et al., 2014). Entre as mudanças mais expressivas que ocorreram durante a domesticação, destacam-se: perda da capacidade de dispersão natural; diminuição dos mecanismos de proteção contra pragas e doenças e perda da dormência de sementes (ROMAN, 2010).

Pickersgill (2007) relata que a domesticação das espécies de pimenta tenha ocorrido independentemente, em três regiões: *C. annuum* var. *annuum* e *C. frutescens* na Mesoamérica, *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. pubescens* na região Andina, e *C. chinense* na região da planície tropical da América do Sul.

As espécies domesticadas de *Capsicum* são autógamas, podendo ocorrer fluxo gênico entre variedades e até mesmo entre espécies do gênero, pois existe certa taxa de alogamia (RIBEIRO & REIFSCHNEIDER, 2008). Segundo Tanksley (1984) a alogamia em pimentas pode variar de 0% a 83%,

sendo facilitada por alterações morfológicas na flor, pela ação de insetos polinizadores, prática de cultivo entre outros fatores.

Estudos citológicos mostram que a maioria das espécies é diploide, algumas possuem $2n=2x=24$ cromossomos, enquanto grande parte das espécies silvestres possuem $2n=2x=26$ (POZZOBON et al., 2006; MOSCONE et al., 2007). São cultivadas como anuais, no entanto, existem plantas bianuais e perenes (BOSLAND, 1996). O caule é semilenhoso e arbustivo, podendo ultrapassar um metro de altura. As raízes são pivotantes, com elevado número de ramificações laterais. As folhas apresentam tamanho, coloração, formato e pilosidade variáveis, sendo a cor verde predominante, apesar de existirem folhas violetas e variegadas. As hastes podem apresentar ou não antocianina e variar de glabras até muito pilosas (FILGUEIRA, 2008; LIM, 2013).

Os frutos são do tipo baga, podendo exibir dois ou mais lóculos, os quais são divididos por uma placenta central, onde estão fixadas as sementes. O número e cor das sementes podem variar quanto à espécie. A elevada variabilidade morfológica apresentada pelos frutos é destacada pelas múltiplas formas, tamanhos, cores, posição e teor de capsaicina (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008) (Figura 1).

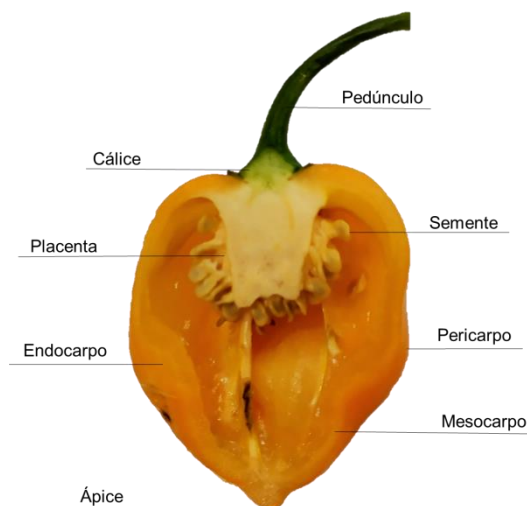


Figura 1. Características anatômicas de um fruto de pimenta.
Fonte: Arquivo pessoal.

A qualidade dos frutos de pimentas depende de alguns atributos, apontados por Pickersgill (2008) como: cor, sabor, aroma, pungência, propriedades farmacodinâmicas e valores nutricionais.

Para muitos apreciadores de pimentas, a pungência é característica de grande importância. Assim como relatado por Lopes (2008) e por vários amantes da especiaria: “*Pimenta para ser boa tem que arder*”.

A pungência é provocada por alcaloides denominados capsaicinóides, exclusivamente encontrados em frutos de pimentas do gênero *Capsicum*. Foram descritos 22 capsaicinóides (BOSLAND & VOTAVA, 1999), no entanto, a capsaicina (cerca de 70%) e a dihidrocapsaicina (cerca de 20%) são os mais abundantes em frutos de pimentas (LOPES, 2008) (Tabela 2). Estes alcaloides são produzidos em glândulas localizadas na placenta, ou seja, na parte do fruto onde as sementes estão aderidas. O acúmulo de capsaicinóides se dá em bolsas ao longo da epiderme placentária e são liberados após sofrerem algum dano físico (PRASAD et al., 2006; PERREIRA et al., 2015). Quando os frutos são ingeridos, a pungência é percebida como sensação de ardência, calor ou queimação.

A biossíntese dos capsaicinóides é regulada por um complexo poligênico, cuja base genética possui como elementos principais a existência de dois locos com ação epistática duplo dominante, as quais são responsáveis tanto pela pungência, quanto pela presença de moduladores que causam variação contínua na sua expressão (PERREIRA et al., 2015). Desta forma, a característica pungência sofre grande influência do fator ambiente.

O nível de pungência é expresso por escala de nível sensorial, denominada SHU (*Scoville Heat Units* ou Unidade de Calor Scoville), desenvolvida em 1912, pelo farmacologista Wilbur L. Scoville (PICKERSGUILL, 2008). Segundo Reifschneider et al. (2015), os valores podem variar de zero, como a pimenta biquinho a cerca de 1.500.000 SHU, a exemplo das pimentas Bhut Jolokia, Trinidad Morunga Scorpion, entre outras. Atualmente, o híbrido natural Carolina Reaper é apontado como o mais pungente do mundo, com aproximadamente 2.000.000 SHU (DUELUND & MOURITSEN, 2017). Todas as pimentas citadas anteriormente pertencem a espécie *C. chinense*, conhecida pelos frutos aromáticos e picantes.

Tabela 2. Relação de capsaicinóides presentes em frutos de *Capsicum*.

Capsaicina	Dihidrocapsaicina
Homocapsaicina	Isômero de dihidrocapsaicina
Homocapsaicina II	Homodihidrocapsaicina
Norcapsaicina	Homodihidrocapsaicina II
Nornorcapsaicina	Nordihidrocapsaicina
Bis-homocapsaicina	Nornordihidrocapsaicina
Tris-homocapsaicina	3-nor-diidrocapsaicina
Tetra-homocapsaicina	Isômero de Nordihidrocapsaicina
Tetra-homodihidrocapsaicina	Isômero de Nornordihidrocapsaicina
Isômero de Tetra-homodihidrocapsaicina	Bis-homodihidrocapsaicina
Tris-homodihidrocapsaicina	Isômero de Tris-homodihidrocapsaicina

Fonte: Bosland & Votava (2000).

2.1.3. *Capsicum chinense*

Capsicum chinense Jacquin é considerada a mais brasileira dentre as espécies domesticadas, por ser a Bacia Amazônica a área de maior diversidade desta espécie (RIBEIRO & REIFSCHNEIDER, 2008). A característica marcante de *C. chinense* é a grande variabilidade morfológica, expressa nas diferentes formas, tamanhos e cores de frutos (REIFSCHNEIDER, 2000). Os tipos de pimenta mais conhecidos são: biquinho, pimenta-de-cheiro, bode, cumari-do-Pará, murupi e Habanero (REIFSCHNEIDER et al., 2015).

A principal distinção morfológica entre *C. chinense* e as demais espécies cultivadas, é a presença de uma constrição anelar localizada no cálice na união com o pedicelo (CARVALHO et al., 2003; CARVALHO & BIANCHETTI, 2008). A Figura 2 ilustra a ocorrência da constrição anelar supracitada.



Figura 2. Cálice com presença de constrição anelar (esquerda) exclusiva da espécie *Capsicum chinense*. Fonte: Arquivo pessoal.

No Brasil, o cultivo de pimentas, incluído as pertencentes à espécie *C. chinense*, tem se tornado importante fonte de renda, principalmente para pequenos agricultores, em todas as regiões (POZZOBON et al., 2015). Barbosa et al. (2010) destacam a importância da pimenta murupi em comunidades indígenas e não-indígenas do Estado de Roraima, para produção de molhos.

2.2. Importância socioeconômica

2.2.1. Mercado de pimentas

Com a descoberta das Américas e a expansão das rotas de navegação, as pimentas *Capsicum* ganharam o mundo e passaram a ser comercializadas e consumidas por povos de todos os continentes (REIFSCHNEIDER et al., 2015). Hoje as pimentas dominam o mercado mundial de especiarias picantes.

Devido às características de pungência e aroma, as pimentas estão presentes em praticamente todas as cozinhas. Reifschneider et al. (2015) relatam o uso das pimentas na cozinha chinesa, coreana e tailandesa, famosas por suas receitas picantes.

Os frutos de *Capsicum* são amplamente utilizados como condimentos, corantes ou hortaliças frescas (VINALS et al., 1996). São frequentemente consumidos “*in natura*” ou processados na forma de molhos, pápricas (em pó), desidratados em flocos (pimenta calabresa) e em conservas (HENZ & RIBEIRO, 2008).

2.2.2. Informações nutricionais e farmacológicas

Embora as características de pungência, aroma e cor sejam os atributos mais atrativos nas pimentas, os valores nutricionais também devem ser considerados. Os frutos são ricos em proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas, sais minerais (cinzas totais), fibras, carotenoides, flavonoides e metabolitos secundários (REIFSCHNEIDER et al., 2015; Figura 3). Seus benefícios são estendidos à indústria farmacêutica, na elaboração de medicamentos para o tratamento de diversas enfermidades, como: artrites, *herpes zoster*, diabetes neuropáticas, antiinflamatórios, agente anticancerígeno, entre outros (PINTO et al., 2013).

As pimentas são excelentes fontes de vitamina C e A. São ricas também em vitaminas E, K e do complexo B (Tiamina, Riboflavina, Niacina, Ácido pantotênico, B6) (Figura 4), além de carotenoides, como Betacaroteno, Alfacaroteno, Betacriptoxantina, Zeaxantina, Violaxantina e Capsantina (VINÀLS et. al., 1996; REIFSCHNEIDER, 2000; LUTZ & FREITAS, 2008; AGOSTINI-COSTA et al., 2017).

Os carboidratos são componentes predominantes nos frutos de *Capsicum*. A frutose (principal açúcar), juntamente com a glicose constitui cerca de 70% dos açúcares redutores. Pimentas suculentas e vermelhas possuem os maiores níveis de açúcares totais e redutores (REIFSCHNEIDER, 2000; LUTZ & FREITAS, 2008).

Os teores de proteínas e lipídios são altos em pimentas. Todas as variedades possuem pouca caloria (entre 22 kcal e 105 kcal/ 100 g de fruto maduro). Os frutos são importantes fontes de fibras totais (entre 4g a 16g/ 100g), elemento essencial para o processo digestivo. Quanto às cinzas totais, a maior parte do conteúdo presente em pimentas é solúvel em água, o que indica ser fonte de minerais, dentre os quais se destacam o potássio, o magnésio, o ferro, o cálcio e o fósforo (REIFSCHNEIDER, 2000; LUTZ & FREITAS, 2008) (Figura 5).

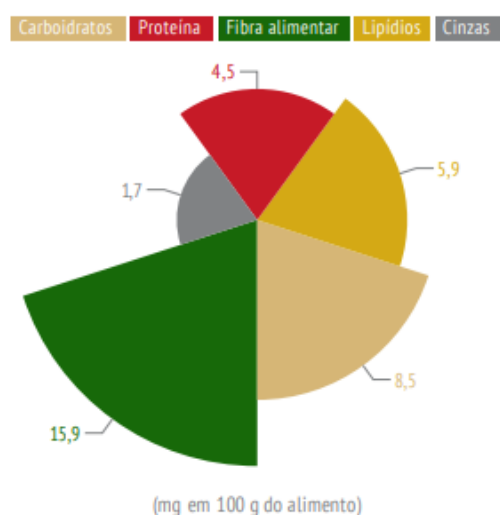


Figura 3. Teores nutricionais presentes em frutos de *Capsicum*.

Fonte: Reifschneider et al., 2015.

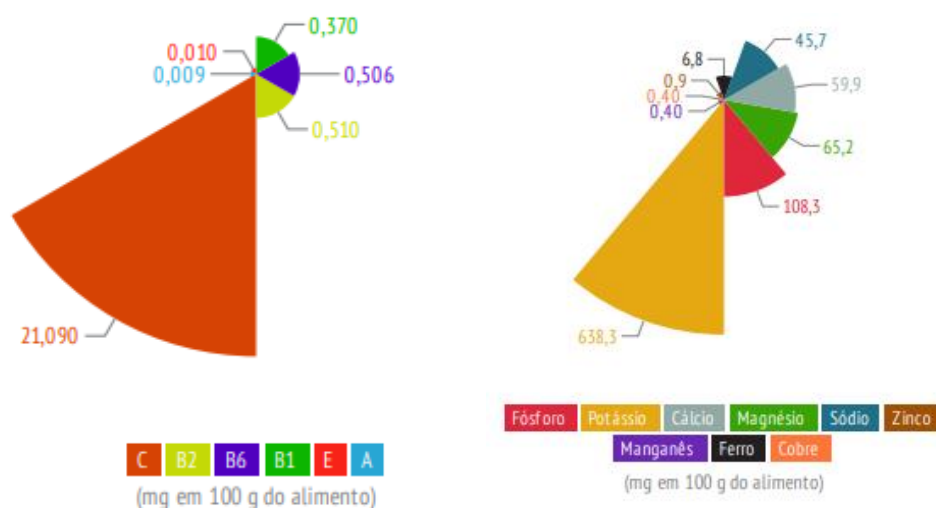


Figura 4. Teores de vitaminas em frutos de *Capsicum*

Fonte: Reifschneider et al., 2015.

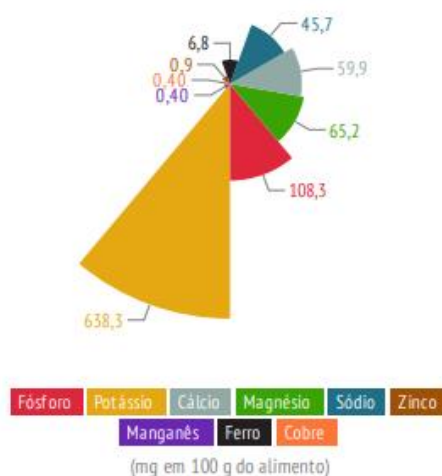


Figura 5. Teores de fontes minerais presentes em frutos de *Capsicum*.

Fonte: Reifschneider et al., 2015.

2.2.3. Dados econômicos

No cenário comercial, estima-se que a produção média mundial de *Capsicum* em 2016 foi de aproximadamente 3,9 milhões de toneladas de produtos secos e 34,5 milhões de toneladas de produtos frescos, cultivados em cerca de 3,7 milhões de hectares (FAO, 2019).

É importante esclarecer que os dados disponibilizados pelo Anuário da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO), não separam espécies de *Capsicum* pungentes das não pungentes em suas

estatísticas. Sendo assim, seus dados referem-se tanto a pimentas picantes, quanto os pimentões e pimentas doces.

Os maiores produtores de pimenta estão no continente asiático, correspondendo a 89% do total de área cultivada no mundo, cujos principais países produtores são: Índia, China, Coreia, Tailândia, Turquia, Vietnã, Sri Lanka e Indonésia. A segunda região mais importante no cultivo de pimentas são os Estados Unidos e o México, com 7% do total plantado. Finalmente, 4% da área cultivada estão em países da Europa, África, América do Sul e Oriente Médio (BOSLAND & VOTAVA, 1996; PICKERSGILL, 2008; PINTO et al., 2013).

No Brasil, o cultivo de pimenta é realizado em todas as regiões, no entanto, há um déficit de dados estatísticos que forneçam informações como a área cultivada e produção nacional. Os principais estados produtores são: Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Ceará, Bahia e Rio Grande do Sul, totalizando área estimada de 5 mil hectares e produção de 75 mil toneladas (REIFSCHNEIDER et al., 2015).

O agronegócio brasileiro de pimentas apresenta grande importância socioeconômica, pois envolve diferentes segmentos da cadeia produtiva, desde a agricultura familiar, pequenas fábricas artesanais, empresas nacionais de processamento de pimenta para pápricas, molhos e conservas até multinacionais que competem no mercado de processamento para exportação (ULHOA et al., 2014).

A abertura de novos nichos de mercado tem se tornado promissor, principalmente para produtos de alto valor agregado, como é o caso de pimentas processadas e convertidas em conservas, geléias, embutidos, massas, biscoitos, ketchups e maioneses (HENZ & RIBEIRO, 2008), além do uso como plantas ornamentais (RÊGO et al., 2012).

A pimenta mais comum em supermercados no Brasil na forma “*in natura*” é a dedo-de-moça, produzida principalmente no estado de São Paulo e comercializada pela Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP) para o restante do país. A pimenta-de-cheiro também é destaque, sendo encontrada em praticamente todos os estados da

federação. Murupi e cumari-do-Pará são os tipos mais cultivados e apreciados no Norte do país. Na região Nordeste, conhecida pelos pratos típicos picantes, predomina a pimenta malagueta. Nos estados do Centro-Oeste brasileiro são cultivadas e consumidas principalmente as pimentas bode, cumari-do-Pará e malagueta. Na região Sul o consumo é considerado pequeno, havendo preferência pelas formas processadas, como molhos, conservas e pimentas desidratadas (RUFINO & PENTEADO, 2006; HENZ & RIBEIRO, 2008).

Na CEAGESP os preços médios são estabelecidos de acordo com diferentes segmentos. Desta forma, os valores médios durante o ano de 2019 foram:

- Pimenta Cambuci: R\$ 4,05 kg⁻¹;
- Pimenta americana - R\$ 3,97 kg⁻¹ e
- Pimenta vermelha (dedo-de-moça) - R\$ 5,23 kg⁻¹ (CEAGESP, 2019).

Na Central de Abastecimento de Goiás S/A (CEASA-GO), Unidade de Goiânia, os preços médios mensais no mercado atacadista durante o ano de 2019 foram:

- Pimenta malagueta - R\$ 20,00 kg⁻¹;
- Cumari - R\$ 15,00 kg⁻¹;
- Biquinho - R\$ 15,00 kg⁻¹;
- Pimenta-de- bode - R\$ 8,00 kg⁻¹;
- Dedo-de-moça - R\$ 8,00 kg⁻¹;
- De-cheiro – R\$ 5,00 kg⁻¹ (CEASA-GO, 2019).

2.3. Melhoramento genético de *Capsicum*

2.3.1. Recursos genéticos

O sucesso no desenvolvimento de novas cultivares está associado diretamente à variabilidade genética dentro de cada espécie. A exploração desta variabilidade permite, por meio das combinações genéticas, o surgimento de novos indivíduos, com características superiores aos seus genitores (RIBEIRO & REIFSCHNEIDER, 2008).

O gênero *Capsicum* é considerado rico em termos de aspectos morfológicos e genéticos, sendo o Brasil importante centro de diversidade (SIGNORINI et al., 2013). Entretanto, essa diversidade genética está em constante ameaça, devido à expansão agrícola e uso indiscriminado das terras. Neste sentido, os bancos de germoplasma tornam-se importantes mecanismos de conservação *in situ*, além de servirem como fonte de material genético para os programas de melhoramento (ONOHAMA et al., 2011).

Apenas no final do século passado, esforços de países americanos foram iniciados no sentido de preservar a diversidade genética em *Capsicum*, ainda encontrada com populações indígenas, ribeirinhas e pequenos produtores rurais (CARVALHO et al., 2003).

Atualmente, a maioria das instituições de pesquisa nacionais e internacionais mantêm bancos ou coleções de germoplasma vegetais, que incluem espécies silvestres, cultivares e tipos especiais, populações, linhagens ou variedades de polinização aberta e híbridos (NASS et al., 2012). O melhorista normalmente recorre a esses bancos para gerar novas cultivares com características de interesse exigidas pelo mercado (REIFSCHNEIDER et al., 2015).

A Embrapa Hortaliças possui um banco ativo de germoplasma (BAG) de *Capsicum* spp. com mais de 4 mil acessos, onde são encontrados exemplares das cinco espécies domesticadas, além de acessos pertencentes a espécies semidomesticadas e a diferentes espécies silvestres encontradas no Brasil (REIFSCHNEIDER et al., 2015; REIFSCHNEIDER et al., 2016). Outras instituições públicas de destaque que conservam materiais genéticos de *Capsicum* em coleções de germoplasma são: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), Embrapa Semiárido, Embrapa Clima Temperado, entre outras (SILVA et al., 2001).

2.3.2. Principais programas de melhoramento

No Brasil o melhoramento genético de pimentas é realizado tanto por empresas públicas como privadas. Entre as instituições públicas, a

Embrapa Hortaliças merece destaque. Hoje o programa de melhoramento genético da instituição é considerado o maior investimento público no desenvolvimento de novas cultivares de pimentas e pimentões (REIFSCHNEIDER et al., 2013). A Embrapa Hortaliças possui linhas de pesquisa direcionadas para diferentes tipos de pimentas e nichos de mercado, desenvolvendo cultivares para pequenos e médios produtores, além de manter parcerias com grandes agroindústrias (RIBEIRO & REIFSCHNEIDER, 2008).

Há mais de três décadas o programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças tem concentrado esforços no desenvolvimento de cultivares, linhas puras, populações e híbridos mais produtivos, uniformes, picantes, com melhor qualidade nutricional, adaptadas a colheita mecanizada e com resistência múltipla às principais doenças que acometem a cultura (REIFSCHNEIDER et al., 2014; NASS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015).

Atualmente, a Embrapa Hortaliças possui número significativo de cultivares desenvolvidas, como exemplo, as cultivares BRS Brasilândia (*C. annum*, híbrido F₁ para páprica); BRS Moema (*C. chinense*, do tipo pimenta biquinho vermelha, cultivar OP desenvolvida para o mercado de conserva e *in natura*); BRS Tui (*C. chinense*, do tipo biquinho salmão, também OP desenvolvida para o mercado de conserva e *in natura*); BRS Seriema (*C. chinense*, do tipo bode, cultivar OP pungente para o mercado de conservas e *in natura*); BRS Mari (*C. baccatum*, do tipo dedo-de-moça, cultivar OP picante, desenvolvida para o mercado de fruto desidratado e *in natura*); BRS Nandaia e BRS Juruti (*C. chinense*, do tipo Habanero laranja e vermelho, respectivamente, desenvolvidas para o mercado de molhos picantes e *in natura*); BRS Garça e BRS Sarakura (*C. annum*, do tipo jalapeño, para o mercado de molho picante) (REIFSCHNEIDER et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015). Dentre as cultivares citadas, BRS Sarakura teve grande impacto no mercado nacional de molhos picantes de pimenta. Desenvolvida em parceria com a empresa do setor privado Sakura Nakaya Alimentos Ltda, hoje é responsável por mais de 50% de todo o molho de pimenta produzido no Brasil (REIFSCHNEIDER et al., 2016).

Programas de melhoramento genético de *Capsicum* também são executados pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), com foco no desenvolvimento de cultivares resistentes às doenças (GONÇALVES et al., 2014; MOREIRA et al., 2015; BENTO et al. 2017; BABA et al., 2019), além de estudos citogenéticos (MOREIRA et al., 2017) e de diversidade genética (MOREIRA et al., 2018). A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) realiza trabalhos direcionados ao desenvolvimento de cultivares para uso ornamental (RÊGO et al., 2012). Estudos de resistência múltipla às doenças são realizados pela Universidade Federal de Lavras (CARVALHO et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2018).

2.3.3. Melhoramento de pimenta Habanero

2.3.3.1. Pimenta Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Originária da Península de Yucatán, região localizada no México, a pimenta Habanero é conhecida pela elevada picância dos seus frutos – estando entre as mais ardidas do mundo – e pela variabilidade de formas, cores e tamanho de frutos (RUIZ-LAU et al., 2011).

Uma típica planta de Habanero apresenta porte médio, podendo chegar a 1m de altura e hábito de crescimento intermediário ou ereto. Seus frutos são geralmente campanulados, com tamanho que pode variar de 2,9 a 6,0 cm de comprimento e 2,5 a 4,6 cm de largura, pesando entre 7 a 12 g. Quando imaturos, são verdes, passando para marfim, amarelo, laranja, vermelho, marron ou roxo, quando maduros (DeWITT & BOSLAND, 2009; CROSBY et al., 2013; REIFSCHNEIDER et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015).

A pimenta Habanero possui grande importância econômica para os produtores de hortaliças de Yucatán, pois ocupa o segundo lugar em área, depois do cultivo de tomate, contribuindo com mais de 90% do volume de pimentas produzidas no estado, sendo comercializada e consumida principalmente *in natura* (RUIZ-LAU et al., 2011). De acordo com Vázquez & Cortez (2018) o rendimento deste tipo de pimenta na região em cultivo tradicional varia de 10 a 40 t ha⁻¹.

Além de Yucatán, o cultivo de Habanero se estende para regiões do Caribe, Norte da América do Sul, Peru e Bolívia. Estados Unidos e Canadá são os principais importadores desta pimenta, em forma de pasta (*mash*), para ser utilizada principalmente na produção de molhos verdes e vermelhos (RUIZ-LAU et al., 2011).

O grupo Habanero ainda é pouco conhecido no Brasil, apesar de haver indícios da sua origem na Amazônia (BARBOSA et al., 2006). O cultivo é realizado por comunidades indígenas (que utilizam sementes nativas) ou por pequenos agricultores, que comercializam os frutos em feiras ou supermercados, na forma *in natura* (BARBOSA et al., 2010). Apesar da baixa exploração comercial, tem crescido o interesse por esse tipo de pimenta, particularmente pelas empresas de produção de molhos picantes (RIBEIRO et al., 2015).

No mercado nacional de sementes, ainda são poucas as cultivares de pimenta Habanero disponíveis. Atualmente, são comercializadas as cultivares Boyra Habanero Vermelha e “Habanero” – Feltrin Sementes; Itagiba Habanero Amarela; BRS Nandaia e BRS Juruti – Isla Sementes e Feltrin Sementes. Vale ressaltar que apenas ‘BRS Nandaia’ e ‘BRS Juruti’ são provenientes de programas brasileiros de melhoramento (RIBEIRO et al., 2015).

2.3.3.2. Programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças

Para atender a demanda do mercado brasileiro, o programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças tem concentrado esforços no desenvolvimento de novas cultivares (REIFSCHNEIDER et al., 2014; NASS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015). Tendo em vista o mercado promissor de pimentas picantes, a instituição lançou nos últimos anos as cultivares de pimenta Habanero BRS Nandaia e BRS Juruti (RIBEIRO et al., 2015).

BRS Nandaia e BRS Juruti são cultivares de polinização aberta, picantes e aromáticas. Ambas apresentam conteúdo aproximado de capsaicina de 200.000 SHU (Unidade de Calor Scoville) e teor de vitamina C de 124 mg/100g de fruto. Possuem alto potencial produtivo, sendo que ‘BRS Nandaia’ produz em média 44 t ha⁻¹ e ‘BRS Juruti’ pode alcançar de 26 a 50 t.ha⁻¹, dependendo do espaçamento, período de colheita e região de cultivo. Os frutos da cultivar

BRS Nandaia são de coloração laranja e da 'BRS Juruti' são vermelhos, quando maduros. Além de produtivas e picantes, as cultivares BRS Nandaia e BRS Juruti apresentam resistência múltipla às doenças. 'BRS Juruti' apresenta resistência de campo ao vírus TSWV, PepYMV e PVY, resistência intermediária à mancha e murcha bacteriana, oídio e *M. incognita*; enquanto 'BRS Nandaia' é altamente resistente ao oídio, resistente ao *M. javanica* e *M. enterolobii*, murcha e mancha bacteriana e possui resistência de campo a PepYMV (RIBEIRO et al., 2019).

Atualmente o programa de melhoramento genético de pimenta Habanero da Embrapa Hortaliças tem se concentrado em novos objetivos, tendo como foco principal o estabelecimento de uma população base de ampla variabilidade genética e obtenção de novas cultivares com características que atendam o mercado de molhos com baixa e elevada concentrações de capsaicinoides (REIFSCHNEIDER et al., 2014; NASS et al., 2015).

2.3.3.3. População base

O gênero *Capsicum* é conhecido pela diversidade genética de suas espécies, no entanto grande parte das atuais cultivares e híbridos recomendados para cultivo apresentam estreitamento da base genética, tornando-as vulneráveis, principalmente, a estresses bióticos (RANGEL et al., 1996). Guo et al. (2010) relatam que o estreitamento da base genética de uma espécie ocorre principalmente devido ao afunilamento da variabilidade genética ocorrido durante a sua domesticação e, recentemente, devido ao processo de melhoramento genético e consecutivas seleções.

A ampliação da variabilidade genética por meio de múltiplos cruzamentos intra ou interespecies pode ser uma forma de recuperar a perda de alelos benéficos. Neste contexto, a formação de populações base, constitui-se etapa primordial em programas de melhoramento que buscam explorar a variabilidade de uma espécie.

Nass et al. (2015) afirmam que o desenvolvimento de populações base com ampla variabilidade genética pode estimular a interação entre bancos de germoplasma e programas de melhoramento, aumentando a possibilidade de uso dos acessos conservados em coleções, além da exploração de novas

combinações genéticas originadas do inter cruzamento entre os acessos selecionados.

O estabelecimento de populações base envolvendo múltiplos cruzamentos tem sido realizado para o aumento de variabilidade genética em soja (ALLIPRANDINI & VELLO, 2004), arroz (BANDILLO et al., 2013), trigo (MACKAY et al., 2014) e mais recentemente, no melhoramento de pimenta Habanero (NASS et al., 2015).

Em 2009, pesquisadores da Embrapa Hortaliças iniciaram um programa de melhoramento genético de pimentas do grupo Habanero a partir da criação de uma população base. O projeto buscou explorar a variabilidade genética de acessos presentes no banco ativo de germoplasma (BAG) de *Capsicum* da instituição, por meio de cruzamentos múltiplos. Desta forma, 31 acessos identificados como Habanero, de diferentes origens, disponíveis no BAG da Embrapa Hortaliças foram utilizados. Os genótipos foram inter cruzados, através de polinizações manuais de flores previamente emasculadas, utilizando uma mistura de pólen (*bulk*) de todos os acessos. Como resultado, foram obtidos 81 híbridos F₁ que posteriormente foram autofecundados, dando origem a genótipos F₂. Uma quantidade equitativa de sementes de cada genótipo F₂ foi misturada, formando assim uma população base de pimenta Habanero com ampla variabilidade genética. Esta população base equilibrada foi introduzida no BAG de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças recebendo o código de identificação CNPH 15.469 (REIFSCHNEIDER et al., 2014; NASS et al., 2015).

Em 2014, foram semeadas cerca de 1000 sementes (6 gramas) da população CNPH 15.469 e, em seguida, transplantadas a campo, para avaliação quanto aos caracteres morfo-agronômicos mínimos para a cultura. Das plantas avaliadas, apenas 17 genótipos foram selecionados por apresentarem-se superiores quanto às características analisadas.

Os genótipos selecionados da população base foram conduzidos por cinco gerações de autofecundação e seleção individual de plantas com teste de progênie até se obter três linhagens de pimenta Habanero (Figura 6).

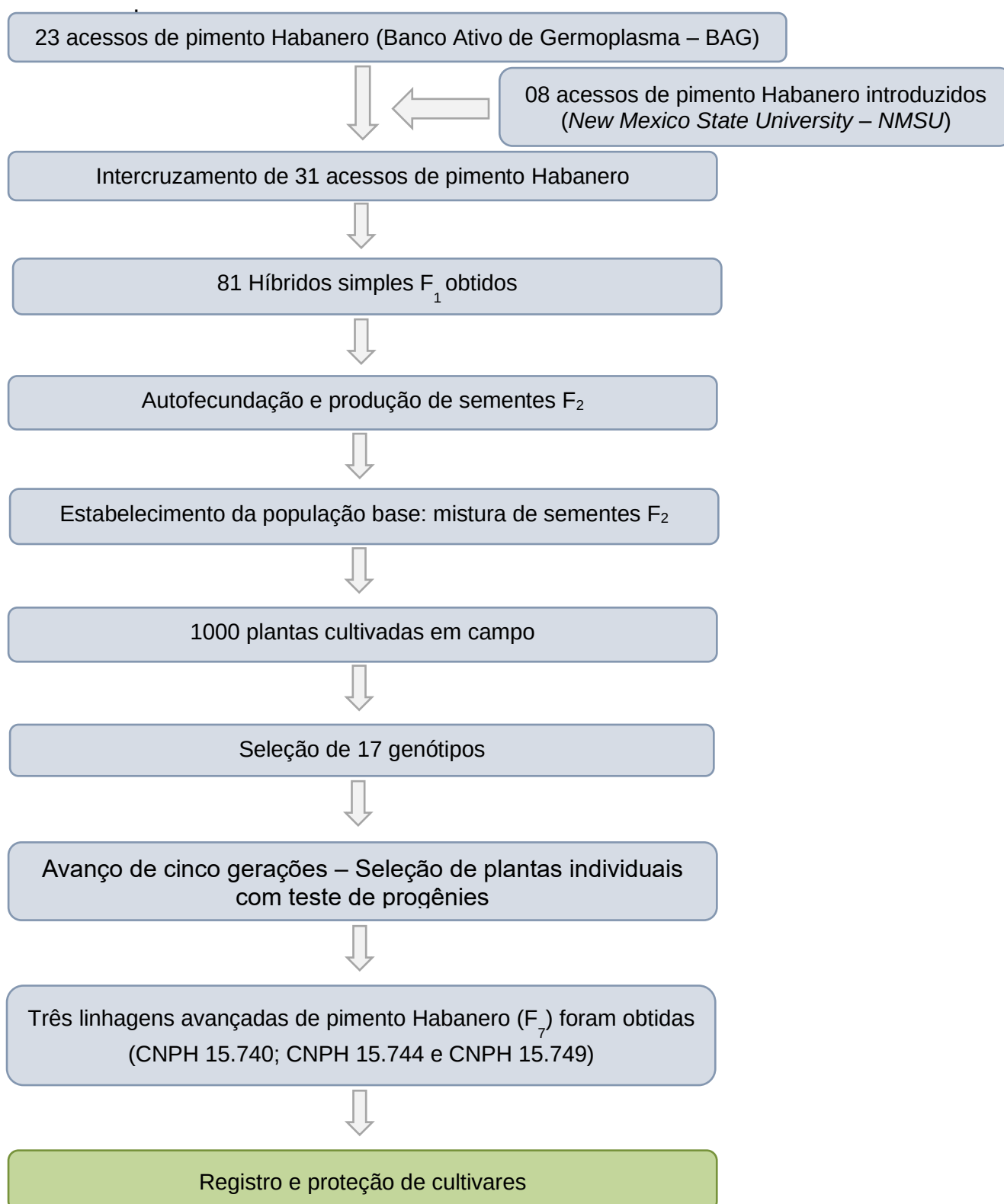


Figura 6. Genealogia do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças para obtenção de três linhagens avançadas de pimenta Habanero.

2.4. Registro e proteção de cultivares

2.4.1. Conceitos

O desenvolvimento de novas cultivares para atender as demandas e exigências dos produtores e consumidores requer tempo, dedicação, conhecimento e alto investimento financeiro (MOREIRA et al., 2010). Como forma de assegurar os direitos à propriedade intelectual às empresas públicas e privadas de pesquisa e habilitar a exploração comercial de sementes e/ou mudas no território nacional, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu, em 1997, mecanismos legais e regulatórios para proteção e registro das inovações (AVIANI & MACHADO, 2011).

A proteção de cultivares é regida pela Lei nº 9.456/97 – denominada Lei de Proteção de Cultivares (LPC) - coordenada pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) e tem como princípio o fortalecimento e padronização dos direitos de propriedade intelectual aos obtentores (BRASIL, 2011). Para as Empresas de pesquisa, a LPC é de grande importância, pois garante o ingresso de recursos decorrentes dos direitos sobre as cultivares desenvolvidas, dando sustentabilidade à continuidade de programas de melhoramento e o subsequente lançamento de novas cultivares (CARVALHO et al., 2009; GOMES et al., 2016).

A lei de proteção de cultivares brasileira baseia-se nas diretrizes propostas pela União Internacional para Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV- sigla em Francês para *Union Internationale pour la Protection des Obtentions Vegetales*), sediada na Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI), em Genebra – Suíça (PIMENTA et al., 2016). A UPOV tem como missão fortalecer e promover um sistema de proteção de variedades vegetais, com o objetivo de encorajar o desenvolvimento de novas cultivares para o benefício da sociedade (AVIANI & MACHADO, 2011; UPOV, 2017).

Criada em 1961 e modificada em 1972, 1978 e 1991, a UPOV realiza atividades direcionadas a harmonização e cooperação internacional, principalmente entre seus membros, e o assessoramento à países e

organizações que se interessem em aderir ao seu sistema de proteção de cultivares (AVIANI & MACHADO, 2011).

Além do Brasil, atualmente 74 países e organizações governamentais são Estados-membros da UPOV, possuindo convivência harmônica para efeitos de implementação dos direitos aos obtentores de novas cultivares (AVIANI & MACHADO, 2011; UPOV, 2017). Dentre os Estados-membros relacionados, 57 países adotam a Ata de 1991, enquanto que 17 membros utilizam a Ata de 1978 e um país (Bélgica) permanece signatário da Ata de 1961/1972 (UPOV, 2017).

O Brasil tornou-se membro da UPOV em 23 de maio de 1999, optando pela convenção de 1978, a qual serviu de base para a elaboração e implementação da Lei de Proteção de Cultivares (AVIANI et al., 2008). De acordo com a Ata de 1978, as variedades protegidas devem ser distintas, homogêneas e estáveis e é proibida a dupla proteção para uma mesma espécie botânica, ou seja, desautoriza que haja uma proteção por patente e outra, concomitante, mediante um sistema *sui generis* (WILKINSON & CASTELLI, 2000). No entanto, quando se observa a legislação brasileira em vigor para a proteção de cultivares, nota-se a existência de diversas características que também são compatíveis com a convenção de 1991 e entre estas se destacam: o conceito de cultivar essencialmente derivada, o prazo do certificado de proteção e a manutenção dos direitos dos pequenos produtores (MOREIRA, 2013).

Apesar das controvérsias sobre a legislação brasileira, a LPC contribui de forma significativa para o desenvolvimento tecnológico e econômico do país, alterando o modelo de geração de tecnologia na área de desenvolvimento de sementes melhoradas em vigor (AVIANI & MACHADO, 2011).

A LPC assegura em seu Art. 9 o direito do obtentor de explorar comercialmente sua criação por meio de *royalties*, ficando proibida a exploração por terceiros (BRASIL, 1997). Desta forma, a legislação estabelece a obrigatoriedade dos usuários de sementes e mudas de adquirir esses materiais propagativos de produtores ou comerciantes inscritos no Renasem (LEITE & CAMPOS, 2011).

A duração da proteção de uma cultivar vigora a partir da data de concessão do Certificado Provisório de Proteção, pelo prazo de 15 anos, com exceção das videiras e árvores (frutíferas, florestais e ornamentais), as quais têm prazo de 18 anos. Após este período, a cultivar entra em domínio público e pode ser explorada, produzida e comercializada sem qualquer restrição (AVIANI, 2011).

Cabe ressaltar que a LPC estabeleceu, em seu Art. 10, exceções ao direito do obtentor da cultivar protegida, quando houver: reserva e plantio de sementes para uso próprio; uso ou venda de produto da colheita, desde que não seja para fins de replantio; uso da cultivar em programas de melhoramento genético; produção para doação ou troca de sementes efetuadas por pequenos produtores rurais, conduzidos por órgãos públicos ou organizações não-governamentais, autorizados pelo Poder Público (BRASIL, 1997; AVIANI, 2011).

Apesar da lei de proteção de cultivares assegurar o direito de propriedade intelectual sobre a cultivar desenvolvida, esta não habilita o titular a produzir e comercializar o material genético. Para isso, é necessário realizar a inscrição no Registro Nacional de Cultivares (RNC) (AVIANI, 2011).

O Registro Nacional de Cultivares (RNC), fundamentado na antiga Lei de Sementes (Decreto nº 81.771, de 7 de junho de 1978), foi instituído pelo MAPA por meio da Portaria nº 527, de 30 de dezembro de 1997. Atualmente, o RNC é regido no âmbito da Lei nº 10.711/03, de 05 de agosto de 2003, e regulamentado pelo Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004, tendo como finalidade a habilitação de cultivares e espécies (florestais, forrageiras, frutíferas, grandes culturas, olerícolas, ornamentais entre outras) para produção, beneficiamento e comercialização de sementes e mudas em todo o território nacional (Brasil, 2019a). Para os programas de melhoramento, é um processo importante, pois assegura a identidade genética e a qualidade varietal das cultivares e ainda resguarda as mesmas contra a degradação decorrente de misturas mecânicas, cruzamentos, trocas de nomes ou denominações e outras ocorrências acidentais (CARVALHO et al., 2009; GOMES et al., 2011).

É comum existir confusão entre proteção e registro de cultivares no Brasil. Todavia, esses processos possuem objetivos e procedimentos distintos, mesmo considerando que o processo de registro de cultivares pode usufruir e até mesmo ser abreviado pelo processo de proteção de cultivares (CARVALHO et al., 2009). Na Tabela 3 são relacionadas as principais diferenças entre proteção e registro de cultivares.

Tabela 3. Aspectos importantes relacionados com a proteção e o registro de cultivares no Brasil.

Aspectos	Proteção de cultivares	Registro de cultivares
Autoridade responsável	SNPC/MAPA	RNC/MAPA
Competência	Proteção do direito intelectual	Registro comercial
Finalidade	Assegurar os direitos exclusivos na exploração comercial da cultivar protegida	Habilitar a cultivar para produção, beneficiamento e comercialização de sementes e mudas
Base legal	Lei nº 9.456/1997 (Lei de Proteção de Cultivares) Decreto nº 2.366/1997 Decreto Legislativo nº 3.109/1999	Lei nº 10.711/2003 (Lei de Sementes e Mudas) Decreto nº 5.153/2004
Requisitos técnicos	Teste de DHE (Distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade)	Testes de VCU (valor de cultivo e uso) para espécies de relevância econômica
Informação gerada	Cadastro Nacional de Cultivares Protegidas	Cadastro Nacional de Cultivares Registradas

Fonte: Aviani (2011).

2.4.2. Importância do registro e proteção de cultivares

O balanço dos 23 anos de aplicação da lei de proteção e do registro nacional de cultivares sugere que seus impactos foram positivos. Houve um aumento significativo nos investimentos dos setores público e privado em programas de melhoramento genético, resultando no desenvolvimento de novas cultivares, mais produtivas e adaptadas às exigências do mercado consumidor (SANTOS et al., 2012).

Marinho et al. (2011), realizando levantamento de registros e proteções das principais espécies agrícolas produzidas no Brasil, no período de 1998 a

2011, verificaram 24.000 registros, envolvendo 4.136 diferentes espécies, enquanto para proteção foram encontradas 1.405 inscrições para 63 espécies. Somente para olerícolas, foram realizados 2.513 registros para sete espécies (tomate, *Capsicum* spp., alface, cenoura, batata, beterraba e batata-doce) e 103 proteções para quatro espécies (batata, alface, cenoura e pimenta).

Gomes et al. (2016), em levantamento realizado entre 1998 e 2014 para 34 olerícolas, verificaram que foram feitos 7.174 registros e 147 proteções no período. Os maiores números de registros foram para as culturas do tomate (20,4%), *Capsicum* spp. (10,6%), alface (8,4%), melão (8,2%) e cebola (5,5%), enquanto para a proteção foram batata (38,8%) e alface (38,0%).

O banco de dados *Cultivarweb* do RNC indica que, em outubro de 2017, pouco mais de 36 mil cultivares tinham sido inscritas no sistema, sendo 8.393 como olerícolas, correspondendo a 23% do total de inscrições. Quanto à proteção, até junho de 2018, foram concedidos títulos para 2.461 cultivares e, deste total, 160 são olerícolas (BRASIL, 2019a; BRASIL, 2019b).

Vale ressaltar que a grande maioria dos registros no RNC e proteções no SNPC são provenientes de instituições privadas, com 93,23% e 87,5%, respectivamente. Sakata Seed Sudamerica, Monsoy e Agristar são as empresas com os maiores números de cultivares registradas e protegidas. O setor público foi responsável por 226 registros e 18 proteções, sendo que a Embrapa foi destaque com 57,22% e 72,22% dos registros e proteções, respectivamente (CARVALHO et al., 2018). Gomes et al. (2016) relatam que o baixo número de registros verificados pelas instituições públicas se deve, principalmente, à falta de incentivo das instituições de fomento (federais e estaduais) e ao baixo desenvolvimento de novas tecnologias.

O gênero *Capsicum* spp. apresenta expressiva participação no registro e proteção de cultivares. Atualmente estão inscritas no sistema da *Cultivarweb* do RNC 895 cultivares de pimentas e pimentões, sendo 744, 59, 50 e 12 registros para as espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum*, respectivamente (Figura 7). Entre as instituições públicas, 25 registros foram identificados e entre esses 19 pertencem à Embrapa [*C. baccatum* ('BRS Coral', 'BRS Ouro' e 'BRS Mari'); *C. chinense* ('BRS Nandaia',

‘BRS Juruti’, ‘BRS Moema’, ‘BRS Seriema’ e ‘BRS Tui’); *C. frutescens* (‘BRS Avaí’); e *C. annuum* (‘BRS Brasilândia’, ‘BRS Ema’, ‘BRS Garça’, ‘BRS Sarakura’, ‘BRS Vilma’, ‘BRS Acará’, ‘BRS Itamira’, ‘BRS Manuela’, CNPH 4510; CNPH 4511)]; dois ao IAC [*C. annuum* (‘Agrônomo 10G’ e ‘IAC Ubatuba’)]; três à UENF [*C. annuum* (UENF Campista; UENF Carioca e UENF Carioquinha)] e uma à UFPA [*C. annuum* (‘Pep 16’)]. Em relação às instituições privadas, 37 empresas requereram registros, sendo a maioria pertencente à Sakata Seed Sudamerica e Agristar, com 168 e 100 registros, respectivamente (BRASIL et al., 2019a).

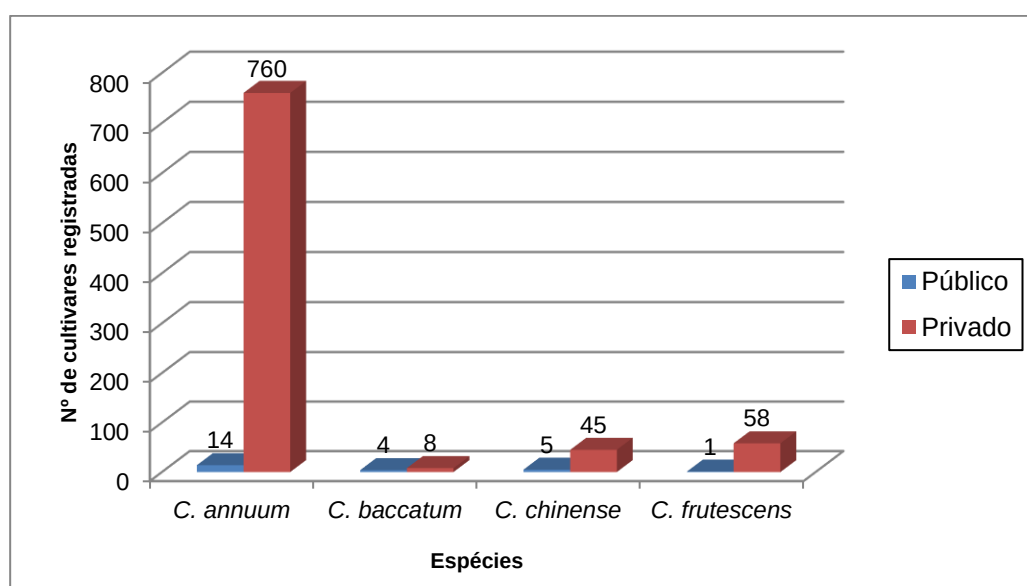


Figura 7. Número de cultivares de *Capsicum* spp., de acordo com quatro espécies, registradas no RNC/MAPA e a participação do setor público e privado.

Quanto à proteção, o banco de dados da *Cultivarweb* do SNPC relaciona 12 cultivares de *Capsicum* spp. protegidas, sendo que destas, quatro pertencem à espécie *C. annuum* (‘BRS Garça’, ‘BRS Sarakura’, ‘CNPH 4510’ e ‘CNPH 4511’); três a *C. chinense* Jacq. (‘BRS Juruti’, ‘BRS Nandaia’, ‘BRS Tuí’) e três não possuem especificação de espécie, sendo consideradas apenas *Capsicum* L. (‘UENF Campista’, ‘UENF Carioca’, ‘UENF Carioquinha’) (BRASIL et al., 2019b). Cabe destacar que todas as cultivares citadas anteriormente são provenientes de programas de melhoramento de instituições públicas de pesquisa.

2.4.3. Requisitos para registro e proteção de cultivares

Para a inscrição de uma determinada cultivar no RNC, deve-se previamente submetê-la a ensaios para determinação do Valor de Cultivo e Uso (VCU) (CARVALHO et al., 2009). Entende-se por VCU o valor intrínseco da combinação das características agronômicas da cultivar com as suas propriedades de uso em atividades agrícolas, industriais, comerciais e de consumo *in natura* (AVIANI et al., 2008).

Os ensaios de VCU podem ser realizados pelo próprio requerente do registro ou por uma instituição de pesquisa e desenvolvimento pública ou privada, por meio de contrato ou convênio. Devem obedecer aos critérios estabelecidos pelo MAPA e contemplar o planejamento e desenho estatístico que permitam a observação, a mensuração e a análise dos diferentes caracteres das distintas cultivares, assim como a avaliação do comportamento e qualidade das mesmas (BRASIL, 2018).

Atualmente são exigidos ensaios para a determinação do VCU para 29 espécies vegetais (BRASIL, 2017). Dentre as hortaliças, foram estabelecidas normas somente para a cultura da batata (AVIANI et al., 2008; CARVALHO et al., 2009). Para as espécies hortícolas que ainda não tenham sido normatizadas, como é o caso das pimentas e pimentões, o pedido de inclusão no RNC deve ser encaminhado separadamente para cada cultivar, mediante o preenchimento de formulário específico (“OUTRAS ESPÉCIES” – FORMULÁRIO IX), disponível no sítio eletrônico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, com apresentação dos seguintes dados: genealogia, principais características morfológicas, biológicas e/ ou fisiológicas que identificam a cultivar, relatório técnico indicando a produtividade, comportamento ou reação às principais pragas e doenças, região de adaptação e outros dados que justifiquem a sua importância para o mercado nacional e internacional (BRASIL, 2018).

Uma cultivar somente poderá obter proteção legal no âmbito da lei de proteção de cultivares caso reúna, concomitantemente, cinco atributos:

novidade, denominação própria, distinguibilidade (D), homogeneidade (H) e estabilidade (E) (AVIANI, 2011; SANTOS, 2012):

- O atributo de **novidade** refere-se ao tempo de comercialização, ou seja, para ser considerada nova, a cultivar não pode ter sido comercializada ou oferecida à venda há mais de 12 meses no Brasil ou seis meses no exterior.
- Quanto à **denominação própria**, a cultivar deverá possuir uma denominação que permita sua identificação, sendo distinta de outra cultivar e não induza a erro quanto às suas características.
- De acordo com a LPC, no seu Art 3º (VI), definiu cultivar **distinta** como “aquela que se distingue claramente de qualquer outra cuja existência seja reconhecida na data do pedido de proteção” (AVIANI, 2011).
- O artigo 3º, item VII, da LPC descreve cultivar **homogênea** como aquela “que utilizada em plantio, em escala comercial, apresente variabilidade mínima quanto aos descritores que a identifiquem, segundo critérios estabelecidos pelo órgão competente” (AVIANI, 2011).
- Uma cultivar é considerada **estável** quando mantém suas características preservadas, em relação aos descritores, em todas as gerações, quando multiplicada em cultivos sucessivos.

Para que uma cultivar candidata à proteção seja considerada distinta, homogênea e estável, a Lei de proteção de cultivares em seu Art. 3, inciso XII, exige que sejam realizados testes preliminares de DHE (BRASIL, 1997). Estes testes devem ser conduzidos a partir de metodologias que assegurem a harmonização das avaliações e a confiabilidade dos dados coletados, estabelecidas pelo SNPC (SANTOS & PACHECO, 2011). No Brasil, os melhoristas são responsáveis legais pela execução dos testes (AVIANI et al., 2008).

2.4.4. Teste de Distinguilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE)

Os Testes de DHE consistem em procedimentos técnicos para comprovar que a nova cultivar se distingue claramente de qualquer outra existente; que seja homogênea quando utilizada em plantio, apresentando variabilidade mínima e que apresente estabilidade, mantendo suas características por meio de sucessivas gerações (MACHADO, 2011).

O primeiro passo para a realização de um teste de DHE é estudar cuidadosamente as diretrizes oficiais para a espécie ou gênero candidato a proteção (SANTOS & PACHECO, 2011). As diretrizes de testes de DHE são documentos técnicos que definem os princípios neles utilizados, por exemplo, o delineamento experimental e as metodologias de análise, além das características a serem observadas (MACHADO, 2011).

Cada país membro da UPOV é responsável pela elaboração das diretrizes legais de execução do teste de DHE. No Brasil, o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) é responsável pela elaboração e divulgação dos regulamentos de testes de DHE, incluindo os descritores mínimos da espécie ou gênero candidato (AVIANI et al., 2008).

O teste de DHE baseia-se principalmente em ensaios de campo, casa de vegetação e/ou laboratório. Nestes testes são avaliados descritores morfológicos, fisiológicos ou ainda bioquímicos capazes de caracterizar e distinguir uma cultivar de outra similar (SANTOS & PACHECO, 2011). Para a realização dos testes é exigido do examinador conhecimento aprofundado sobre a espécie, seu comportamento, grupos e variedades existentes da mesma, sendo indispensável a utilização de cultivares referências para caracterização da nova cultivar (AVIANI et al., 2008).

Os ensaios de DHE só podem ser realizados caso as espécies ou gênero possuam descritores morfológicos publicados no Diário Oficial da União. Quando a espécie não possuir os descritores publicados, fica a cargo do executor do ensaio entrar em contato com o MAPA/SNPC para que as diretrizes possam ser elaboradas e publicadas (BRASIL, 2011).

Para *Capsicum* spp., as instruções para a execução dos ensaios de DHE estão definidas no Ato n.º2, de 22 de março de 2006. De acordo com a

norma, o teste baseia-se em 48 descritores binários e multicategóricos, incluindo características qualitativas e quantitativas, os quais são avaliados desde a germinação passando pela arquitetura das plantas e formato de folha e frutos (CARVALHO et al., 2009). Na Figura 8 são apresentados os descritores mínimos para *Capsicum* spp.

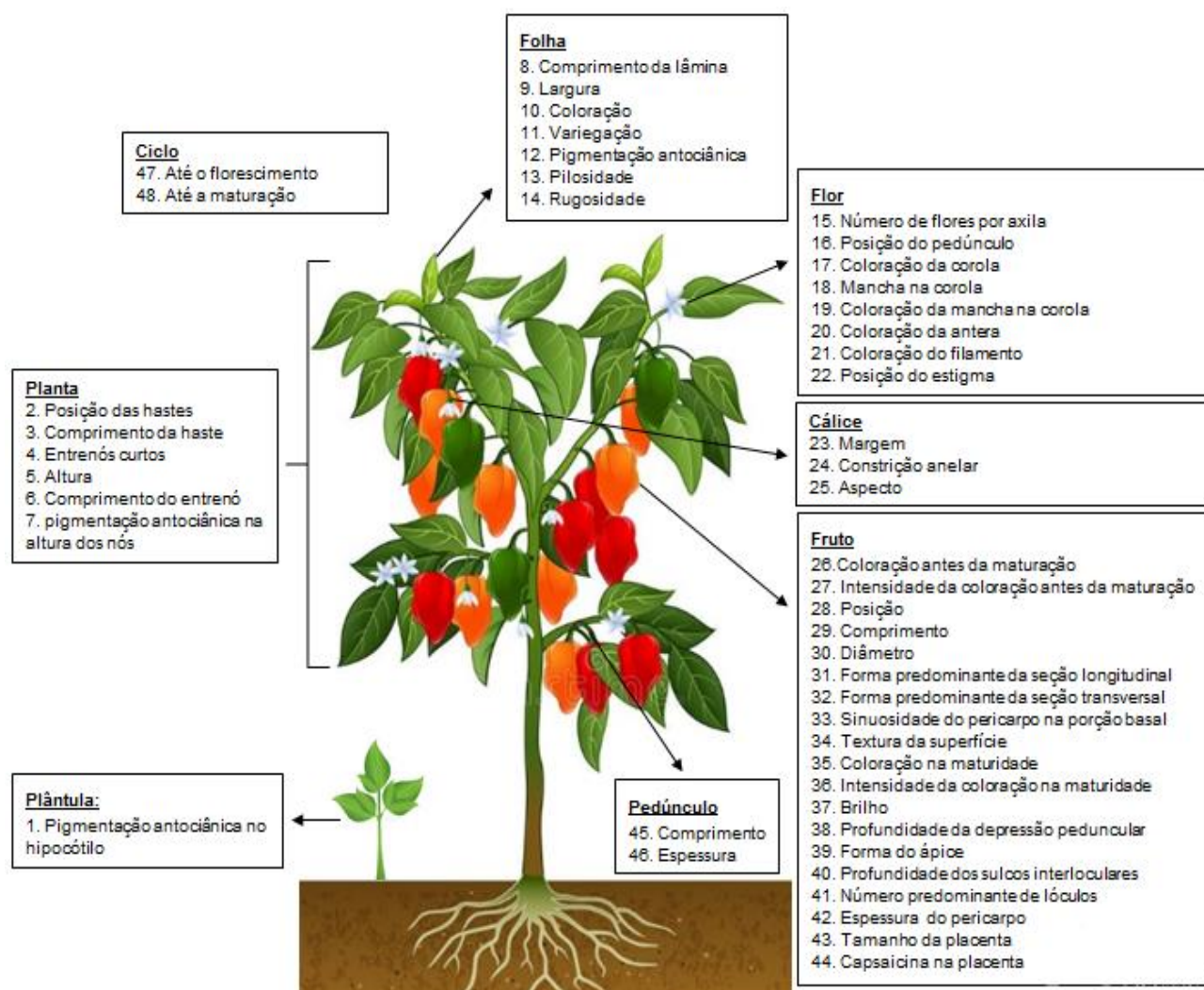


Figura 8. Descritores morfológicos de ensaios de Distingüibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE) de pimentas (*Capsicum* spp.) do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC). Infográfico do autor.

Embora os descritores morfológicos sejam essenciais e obrigatórios para a caracterização de uma cultivar, nos últimos anos testes auxiliares vêm sendo

acrescentados às diretrizes de DHE devido, principalmente, a necessidade de se obter maiores informações sobre o material genético desenvolvido.

Citam-se, por exemplo, como testes complementares, a utilização de marcadores moleculares e reação a doenças (MACHADO, 2011).

2.4.5 Testes adicionais

2.4.5.1. Marcadores moleculares

No âmbito da lei de proteção de cultivares, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramentas complementares nas análises de processos, como por exemplo, na comprovação da origem genética da cultivar, na identificação de cultivares em casos de uso indevidos e na distinção entre cultivares (AVIANI & SANTOS, 2011).

Desde 2009 o SNPC vem ampliando as análises de DNA por marcadores moleculares em cultivares candidatas à proteção de várias espécies. O uso de marcadores moleculares em avaliações complementares ao teste de DHE já foi descrito em trabalhos realizados com a cultura da soja (GARCIA et al., 2007); café (SOUZA et al., 2017); batata (PEREIRA et al., 2018) e *Capsicum* (MOREIRA et al., 2013).

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, os SSR (*Single Sequence Repeat*), ou microssatélites, são utilizados com sucesso na diferenciação de cultivares, devido à sua alta reprodutibilidade (TOPPA & JADOSKI, 2013), além de terem herança codominante e serem altamente multialélicos (BUSO et al., 2016). Moreira et al. (2013) reforçam que o uso de marcadores microssatélites é uma abordagem útil e poderosa para análise genômica detalhada e, juntamente com a caracterização morfológica, pode fornecer informações mais precisas e concisas para a diferenciação de linhagens candidatas à proteção de cultivares.

2.4.5.2. Resistência às doenças

A caracterização de cultivares candidatas à proteção baseada na reação a fatores bióticos, como pragas e doenças, torna-se de fundamental

importância e pode ser utilizada intencionalmente como caracteres nos testes de DHE (MACHADO, 2011).

Nos últimos tempos, tem se observado esforços de melhoristas de plantas e fitopatologista na busca de incorporação de genes de resistência nas novas cultivares. Tal preocupação é movida pela demanda do setor agropecuário por produtividade, adaptação a diferentes ambientes e menor dependência de produtos fitossanitários (LOVATO, 2011).

No gênero *Capsicum* são relatados diversos agentes patogênicos que afetam diretamente a cultura. A maioria destes fitoparasitas causa efeito devastador em áreas de cultivo de pimentas, podendo acarretar perdas de até 100% da produtividade.

Dentre os patógenos que atacam as pimentas do gênero *Capsicum*, destacam-se aqueles que são associados ao solo (NARESH et al., 2019). Os principais patógenos de solo reportados para pimentas são: *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* sp. nov (LEBEAU et al., 2011; GRANKE et al., 2012; ROSSATO et al., 2018), *Phytophthora capsici* Leonian (REEVES et al., 2013; SÁNCHEZ-CHÁVEZ et al., 2017), e os nematoides do gênero *Meloidogyne* (PINHEIRO et al., 2014). Fitoparasitas associados à parte aérea também são relatados causando sérios danos à cultura, podendo citar várias espécies de vírus e bactérias, como por exemplo, os vírus do gênero *Potyvirus* - *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Potato virus Y* (PVY), os tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), o tobamovírus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) e o cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (CMV) (JANZAC et al., 2009; SCHOLTHOF et al., 2011; ÖZKAYNAK et al., 2014) e as bactérias do gênero *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria* e *X. gardneri*) (ROACH et al., 2018).

3. REFERÊNCIAS

ANDREWS, J. **Peppers: the domesticated *Capsicum***. University of Texas Press: Austin. 1984. 170p.

AGOSTINI-COSTA, T.S.; GOMES, I.S.; MELO, L.A.M.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C. Carotenoid and total vitamin C content of peppers from selected Brazilian cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 73–79. 2017.

ALLIPRANDINI, L.F.; VELLO, N.A. Heritability and correlations among traits in four-way soybean crosses. **Euphytica**, v.136, p.81-91, 2004.

AVIANI, D.M.; SANTOS, F.S.; CARVALHO, I.M.; MACHADO, V.L.S.; PACHECO, L.G.A.; CARPI, V.A.F. Abordagem sobre registro e proteção de cultivares. In: FALEIROS, F.G, FARIAS NETO, A.L., RIBEIRO JUNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: uma abordagem estratégica**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 152-168.

AVIANI, D.M. Requisitos para proteção. In: **Proteção de cultivares no Brasil**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 17-22, 2011.

AVIANI, DM; MACHADO, RM. União internacional para proteção das obtenções vegetais (UPOV). In: **Proteção de cultivares no Brasil**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 17-22, 2011.

AVIANI, D.M.; MACHADO, R.Z. Proteção de cultivares e inovação. In: BUAINAIN, AM; BONACELLI, MBM; MENDES, CIC. (Org.). **Propriedade Intelectual e Inovações na Agricultura**. 1ed.Brasília; Rio de Janeiro: CNPq, FAPERJ, INCT/PPED, IdeiaD, v. 1, p. 225-243, 2015.

AVIANI, D.M., SANTOS, F.S. Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares. IN: Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Proteção de Cultivares no Brasil. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 155-160, 2011.

BABA, V.Y.; CONSTANTINO, L.V.; IVAMOTO, S.T.; MOREIRA, A.F.P.; MADEIRA, T.B.; NIXDORF, S.L.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A. *Capsicum-Colletotrichum* interaction: Identification of resistance sources and quantification of secondary metabolites in unripe and ripe fruits in response to anthracnose infection. **Scientia Horticulturae**, v. 246, p. 469-477, 2019.

BANDILLO, N., RAGHAVAN, C., MUYCO, P.A., SEVILLA, M.A.L., LOBINA, I.T., DILLA-ERMITA, C.J., TUNG, C., MCCOUCH, S., THOMSON, M., MAULEON, R., SINGH, R.K., GREGORIO, G. REDOÑA, E., HEI LEUNG, H. Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. **Rice**, v. 6, p. 11, 2013.

BARBOSA, R.I.; LUZ, F.J.F.; NASCIMENTO FILHO, H.R.; MADURO, C.B. **Pimentas de Roraima** (Catálogo de Referência). Manaus, INPA/EDUA. 2006. 93p.

BARBOSA, R. I., MOURÃO JÚNIOR, M.; LUZ, F. J. F. Morphometric patterns and preferential uses of *Capsicum* peppers in the State of Roraima, Brazilian Amazonia. **Horticultura Brasileira**, v.28, p.477-482, 2010.

BARBOZA, G.E.; BIANCHETTI, L.B. Three new species of *Capsicum* (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. **Systematic Botany**, New York, v. 30, n. 4, p. 863-871, 2005.

BENTO, C.S.; DE SOUZA, A.G.; SUDRÉ, C.P.; PIMENTA, S.; RODRIGUES, R. Multiple genetic resistances in *Capsicum* spp. **Genetics and molecular research**, v. 16, p. 10.4238/gmr1603, 2017.

BOSLAND, P. W. *Capsicum*: innovative uses of ancient crop. In: JANICK, J. (eds.) **Progress in new crop**. ASHS Press, Arlington, Virginia, 1996. p.479-487.

BOSLAND, P. W. Chiles: a gift from a fiery god. **HortScience**, Pleasanton, v. 34, p. 809-811, 1999.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: Vegetable and spice *Capsicums***. CABI Publishing, Wallingford, UK, 1999. 230p.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. Peppers: vegetable and spice *Capsicums*. **Crops Production Science in Horticulture**, Wallingford, v. 12, n. 1, p. 204, 2000.

BOSLAND, P.W.; COON, D. 'NuMex Trick-or-Treat', a No-heat Habanero Pepper. **HortScience**, v.50, p. 1739–1740, 2015.

BRASIL (1997) Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. **Lei de proteção de cultivares**. Diário oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 28 de abril de 1997, 79:8241-8246, seção1.

BRASIL (2011) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 202 p.

BRASIL (2017) **Registro Nacional de Cultivares – RNC**. <http://www.agricultura.gov.br/guia-de-servicos/registro-nacional-de-cultivares-rnc>. Acesso em 10 out. 2019. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL (2019a) **Lista de cultivares protegidas**. Disponível em: http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acesso em 10 out. 2019. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL (2019b) **Lista de cultivares protegidas**. Disponível em: http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php. Acesso em 10 out. 2019. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BUSO, G.S.C.; REIS, A.M.M.; AMARAL, Z.P.S.; FERREIRA, M.E. Novel and highly informative *Capsicum* SSR markers and their cross-species transferability. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1-13, 2016.

CARVALHO, I. C. C.; BIANCHETTI, L. B.; BUSTAMANTE, P. G.; SILVA, D. B. da. **Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. (Embrapa Hortaliças, documentos, 49). 49p.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; HENZ, G.P. Germplasm collection of *Capsicum* spp. maintained by Embrapa Hortaliças (CNPH). ***Capsicum and Eggplant Newsletter***, v.22, p.17-20, 2003.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-53.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 135-138, 2009.

CARVALHO, B. L.; GUILHERME, S. R.; GUEDES, M. L.; FERREIRA, R. A. D. C.; CARDOSO, G. A.; NHANENGUE, C. L.; RODRIGUES, C. S.; TEIXEIRA, R. K. S.; ALVES, N. B.; RAMALHO, M. A. P. **Síndrome da domesticação das plantas cultivadas**. 1. ed.; Lavras: Fundecc, 2014. 42 p.

CARVALHO, R. C.; NOGUEIRA, D. W.; TICONA-BENAVENTE, C. A.; MALUF, W. R. Assessment of resistances to multiple pathogens in experimental sweet pepper hybrids. **Horticultura Brasileira**, v. 35, p. 48-56, 2017.

CARVALHO, S.I.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C.; BIANCHETTI, L.B. ; FERNANDEZ, F.L. Experience with Descriptors, Registration and Protection of vegetable cultivars: eggplant as a case study. **Horticultura Brasileira**, v. 36, p. 146-155, 2018.

CASTRO-CONCHA, L.A.; TUYUB-CHE, J.; MOO-MUKUL, A.; VAZQUEZ-FLOTA, F.A.; MIRANDA-HAM, M.L. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero

pepper) at different stages of ripening. **The Scientific World Journal**, v.195, p. 1-5, 2014.

CEAGESP. **Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo**, 2019. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/>. Acesso em 15 nov. 2019.

CEASA-GO. **Centrais de Abastecimento de Goiás S.A.** 2019. Disponível em: <http://www.ceasa.go.gov.br/indicadores/cotacoes.html>. Acesso em 15 nov. 2019.

CHIOU, K.L.; HASTORF, C.A.; BONAVIA, D.; DILLEHAY, T.D. Documenting cultural selection pressure changes on chile pepper (*Capsicum baccatum* L.) seed size through time in Coastal Peru (7,600 B.P. - Present). **Economic Botany**, v. 68, p.190-202, 2014.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1261 p.

CROSBY, K.M.; FERY, R.L.; LESKOVAR, D.I.; BUTCHER, J. 'CaroTex-312', a high yielding, orange-fruited, Habanero-type, F1 hybrid pepper. **HortScience**, v. 48, p. 1059-1061, 2013.

DeWITT, D.; BOSLAND, P.W. **The complete Chile Pepper Book. A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving and Cooking**. Timber Press. Portland London, 2009. 336p.

DUELUND, L.; MOURITSEN, O.G. Contents of capsaicinoids in chillies grown in Denmark. **Food chemistry**, v. 221, p. 913–918, 2017.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 25 nov. 2019.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Editora UFV. Viçosa: UFV, 2008. 402p.

GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by

evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v.140, p. 794–802, 2013.

GOMES, G.P.; GONÇALVES, L.S.A.; SEKIYA, A.; EUZEBIO, M.P.; ROBAINA, R.R.; MARINHO, C.D. Registro e proteção de olerícolas no Brasil, período de 1998 a 2014. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 019-026, 2016.

GONÇALVES, L.S.A.; GOMES, V.M.; ROBAINA, R.R.; RODRIGUES, R.; VALIM, R.H.; ARANHA, F.M. Resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne enterolobii*) in *Capsicum* spp. accessions. **Agrária**, v. 9, p. 49-52, 2014.

GRANKE, L.L.; QUESADA-OCAMPO, L.; LAMOUR, K.H.; HAUSBECK, M.K. Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. **Plant Disease**, v. 96, p. 1588–1600, 2012.

GUO, J.; WANG, Y.; SONG, C.; ZHOU, J.; QIU, L.; HUANG, H.; WANG, Y. A single origin and moderate bottleneck during domestication of soybean (*Glycine max*): implications from microsatellites and nucleotide sequences. **Annals of Botany**, v. 106, n. 3, p. 505-514, 2010.

HENZ, G.P.; RIBEIRO, C.S.C. Mercado e comercialização. In: RIBEIRO, C.S.C.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas Capsicum**. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008. p. 15-24.

HILL, T. A.; ASHRAFI, H.; WO, R. C. S.; YAO, J.; STOFFEL, K.; TRUCO, J. M.; KOZIK, A.; MICHELMORE, R. W.; DEYNZE, A. V. Characterization of *Capsicum annuum* Genetic Diversity and Population Structure Based on Parallel Polymorphism Discovery with a 30K Unigene Pepper GeneChip. **Plos One**, California, v.8, n.2, p.1-16, 2013.

JANZAC, B.; FABRE, M.F.; PALLOIX, A.; MOURY, B. Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against potyviruses, and selection of virulent variants. **Plant Pathology**, v. 58, p. 443–449, 2009.

JEEATID, N.; SURIHARN, B.; TECHAWONGSTIEN, S.; CHANTHAI, S.; BOSLAND, P.W.; TECHAWONGSTIEN, S. Evaluation of the effect of genotype-

by-environment interaction on capsaicinoid production in hot pepper hybrids (*Capsicum chinense* Jacq.) under controlled environment. **Scientia Horticulturae**, v. 235, p. 334–339, 2018.

KIM, S.; PARK, M.; YEOM, S.I. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. **Nature Genetics**, v.46, p. 271-278, 2014.

LEBEAU, A.; DAUNAY, M.C.; FRARY, A.; PALLOIX, A.; WANG, J.F.; DINTINGER, J.; CHIROLEU, F.; WICKER, E.; PRIOR, P. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: Genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Phytopathology**, v. 101, p. 154-165, 2011.

LEITE, M.V.; CAMPOS, S.R.F. Aspectos legais da produção, comercialização, e do uso de sementes no Brasil. In: AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F. (Eds.). *Proteção de cultivares no Brasil*. Brasília: MAPA/ACS, 2011. p.93-96.

LIM, T.K. **Edible Medicinal and Non-medicinal plantas. *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. Springer, v. 6, n. 23, 2013. 202p.

LOPES, C. A. Ardume, picância e pungência. In: RIBEIRO, C. S. C.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008. p. 25-30.

LÓPEZ-PUC, G.; CANTO-FLICK, A.; SANTANA-BUZZY, N. El reto biotecnológico del chile Habanero. *Ciencia*, v.3, p. 30-35, 2009.

LOVATO, F.A. Uso de características de resistência a doenças e testes de DHE. In: **Proteção de cultivares no Brasil**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 147-154, 2011.

LUTZ, D.L.; FREITAS, S.C. Valor nutricional. In: RIBEIRO, C.S.C.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008. p. 55-70.

MACHADO, R.M. Elaboração de diretrizes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE). In: **Proteção de cultivares no Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. 2011. p. 17-22.

MACKAY, I.J.; BANSEPT-BASLER, P.; BARBER, T.; BENTLEY, A.R.; COCKRAM, J.; GOSMAN, N.; GREENLAND, A.J.; HORSNELL, R.; HOWELLS, R.; O'SULLIVAN, D.M.; ROSE GA; HOWELL PJ. An eight-parent multiparent advanced generation intercross population for winter-sown wheat: creation, properties and validation. **G3, genes, Genomes, Genetics**, v.4, p.1603-1610, 2014.

MARINHO, C.D.; MARTINS, F.J.O.; AMARAL, S.C.S.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; GONÇALVES, L.S.A.; MELLO, M.P. Revisiting the Brazilian scenario of registry and protection of cultivars: an analysis of the period from 1998 to 2010, its dynamics and legal observations. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p. 792-809, 2011.

MEDINA-LARA, F.; ECHEVARRÍA-MACHADO, I.; PACHECO-ARJONA, R.; RUIZ-LAU, N.; GUZMÁN-ANTONIO, A.; MARTINEZ-ESTEVEZ, M. Influence of Nitrogen and Potassium Fertilization on Fruiting and Capsaicin Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). **HortScience**, v.43, p.1549–1554, 2008.

MEYER, R.S.; PURUGGANAN, M.D. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, p. 840–852, 2013.

MOREIRA, S.O.; SILVA, M.G.M.; RODRIGUES, R.; VIANA, A.P.; PEREIRA, M.G. Breeding methods and history of bean cultivars released in CBAB – Crop Breeding and Applied Biotechnology. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p.345-350, 2010.

MOREIRA, S.O.; RODRIGUES, R.; OLIVEIRA, H.S.; MEDEIROS, A.M.; SUDRE, C.P.; GONCALVES, L.S.A. Phenotypic and genotypic variation among

Capsicum annuum recombinant inbred lines resistant to bacterial spot. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 1232-1242, 2013.

MOREIRA, S.O.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; RIVA, E. M.; RIVA-SOUZA, E.M. Resistência à mancha-bacteriana e características agronômicas de linhas recombinadas de *Capsicum annuum* L. **Agrária**, v. 10, p. 198-204, 2015.

MOREIRA, N.F.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, K.C. Meiotic analysis of interspecific hybrids between *Capsicum frutescens* and *Capsicum chinense*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 159-163, 2017.

MOREIRA, A.F.P.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; BABA, V.Y.; GIORDANI, W.; ARRUDA, I.M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A. Genetic diversity, population structure and genetic parameters of fruit traits in *Capsicum chinense*. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 1-9, 2018.

MOSCONE, E.A.; ESCALDAFERRO, M.A.; GABRIELLE, M.; CECCHINI, N.M.; GARCÍA, Y.S.; JARRET, R.; DAVIÑA J.R.; DUCASSE, D.A.; BARBOZA, G.E.; EHRENDORFER, F. The evolution of the chili pepper (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. **Acta Horticulturae**, Seoul-Korea, v.745, p.137-169, 2007.

NARESH, P.; MEENU, K.; ACHARYA, G.C.; REDDY, A.C.; LAKSHMANA, D.C.R. Genetics and molecular markers for resistance to major soil borne pathogens in chilli (*Capsicum annuum* L.). **Research Journal of Biotechnology**, v.14, p. 101-105, 2019.

NASS, L.L.; SIGRIST, M.S. Espécies silvestres: potencial de exploração via pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R (Eds.) **Domesticação e Melhoramento – Espécies Amazônicas**. Editora UFV, Viçosa, 2009.

NASS, L.L.; SIGRIST, M. S.; RIBEIRO, C.S.C.; REIFSCHNEIDER F.J.B. Genetic resources: the basis for sustainable and competitive plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, S2, p. 75-86, 2012 (Special edition).

NASS, L.L.; SOUZA, K.R.R.; RIBEIRO, C.S.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Synthesis of a base population of Habanero pepper. **Horticultura Brasileira**, v.33, p.530-532, 2015.

NOGUEIRA, D.G.; CARVALHO, R.C.; MALUF, W.R.; NOGUEIRA, D.W. Heterosis and combining ability in bell pepper lines with resistance to multiple pathogens. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 49, p. 93-102, 2018.

NUEZ, F.; ORTEGA, R. G.; COSTA, J. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madri: Mundi-Prensa, 1996. 607p.

ONOHAMA, S.S. Coletando, conservando e utilizando a biodiversidade de pimentas em Goiás: agregando conhecimento e valor do bioma à agroindústria. **Ateliê Geográfico**. V.5, p.106-122, 2011.

ÖZKAYNAK, E.; DEVRAN, Z.; KAHVECI, E.; DOĞANLAR, S.; BAŞKÖYLÜ, B.; DOĞAN, F.; YÜKSEL, M. Pyramiding Multiple Genes for Resistance to PVY, TSWV and PMMoV in Pepper Using Molecular Markers. **European Journal of Horticultural Science**, v. 79, p. 233–239, 2014.

PADILHA, H.K M.; ROSA LÍA BARBIERI, R.L. Plant breeding of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae) – A review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.10, p.148-154, 2016.

PEREIRA, I.S.; BARRETO, F.Z.; BALSALOBRE, T.W.A.; SALA, F.C.; COSTA, C.P.; CARNEIRO, M.S. Validação de marcadores moleculares associados à pungência em pimenta. **Horticultura Brasileira**, v.33, p.189-195, 2015.

PEREIRA, A.S.; SILVA, G.O.; BERTONCINI, O.; CASTRO, C.M.; BORTOLETTO, A.C.; HIRANO, E.; AZEVEDO, F.Q.; LIMA, M.F.; GOMES, C.B.; DUTRA, L.F.; SUINAGA, F.A.; CARVALHO, A.D.F.; MELO, P.E.; LOPES, C.A.; REISSER JUNIOR, C.; PINHEIRO, J.B.; MEDEIROS C.A.B.; KROLOW, A.C.R.; CASTRO, L.A.S.; NAZARENO, N.R.X. BRS F63 (Camila): A fresh market potato cultivar, with high yield potential and resistance to virus Y. **Horticultura Brasileira**, v. 36, p. 136-140, 2018.

PICKERSGILL, B. Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, v. 100, p. 925-940, 2007.

PICKERSGILL, B. **Peppers and chillies**. Whiteknights: University of Reading, School of Plant Sciences, Department of Agricultural Botany, 2008. 15 p.

PIMENTA, S.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; MORAES, J.G.T.; BENTO, C.S.; MEDEIROS, A.M. Protecting vegetable cultivars in Brazil: a chili pepper case-study research. **Horticultura Brasileira**, v.34, p.161-167, 2016.

PINHEIRO, J.B.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; PEREIRA, R.B.; MOITA, A.W. Reação de genótipos de *Capsicum* ao nematoide das galha. **Horticultura Brasileira**, v.32, p. 371-375, 2014.

PINTO, C.M.F.; PINTO, C.L.O.; DONZELES, S.M.L. Pimenta *Capsicum*: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.3, p.108-120, 2013.

POZZOBON, M.T.; WITTMAN, S.; BIANCHETTI, L.B. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: $x=12$ and $x=13$ represent two evolutionary lines. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.151, n.2, p.259-269, 2006.

POZZOBON, M.T.; BIANCHETTI, L.B.; SANTOS, S.; CARVALHO, S.I.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C. Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do Banco de Germoplasma da Embrapa, Brasil. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 13, n. 2, p. 96-100, 2015.

PRASAD, B.C.N.; KUMAR, V.; GURURAJ, H.B.; PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P. Characterization of capsaicin synthesis and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). **PNAS**, v. 103, n. 36, p. 11315-11320, 2006.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Capsicum. Pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, Brasília, 2000. 113p.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C. CULTIVO. In: RIBEIRO, C.S.C.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas Capsicum**. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008. p. 55-70.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C.; CARVALHO, S.I.C. Development of new *Capsicum* cultivars at Embrapa (Brazil). In: **XV Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant**, 2013, Turim. Breakthroughs in the Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant. Turim, Italia: Eucarpia, 2013. p. 71-77.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; NASS, L.L.; RIBEIRO, C.S.C. Establishment of a Habanero-type pepper (*Capsicum chinense*) synthetic base population. In: **INTERNATIONAL PEPPER CONFERENCE**, 22. *Book of abstracts*. Viña del Mar: Serie Actas INIA N° 55, 2014. p.28.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; NASS, L.L.; HENZ, G.P. **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. 1. ed. Brasília, 2015. 156 p.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; LOPES, C.A.; RIBEIRO, C.S.C. Continuity, focus and impact: a commented historical perspective on Embrapa Vegetables' extended *Capsicum* breeding program. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 155-160, 2016.

RÊGO, E.R.; NASCIMENTO, M.F.; NASCIMENTO, N.F.F.; SANTOS, R.M.C.; FORTUNATO, F.L.G.; REGO, M M. Testing methods for producing self-pollinated fruits in ornamental peppers. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 708-711, 2012.

REEVES, G.; MONROY-BARBOSA, A.; BOSLAND, P.W. A Novel *Capsicum* Gene Inhibits Host-Specific Disease Resistance to *Phytophthora capsici*. **Phytopathology**, v. 103, p. 472-478, 2013.

RIBEIRO, C.S.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Genética e melhoramento. In: RIBEIRO, C.S.C.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008. p. 55-70.

RIBEIRO, C.S.C.; SOUZA, K.R.R.; CARVALHO, S.I.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. BRS Juruti: the first Brazilian Habanero-type hot pepper cultivar. **Horticultura Brasileira**, v.33, p. 527-529, 2015.

RIBEIRO, C.S.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; BUSO, G.S.C. Embrapa's *Capsicum* Breeding Program - Looking back... into the Future. **Crop Breeding, Genetics and Genomics**, v. 2, p. 1-26, 2019.

ROACH, R.; MANN, R.; GAMBLEY, C.G.; SHIVAS, R.G.; RODONI, B. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, *Capsicum* and chilli crops in eastern Australia. **European Journal of Plant Pathology**, v.150, p. 595–608, 2018.

RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; KOLLMANNNSBERGER, H.; GONZALEZ-MAS, M.C.; NITZ, S.; NUEZ, F. HS-SPME Comparative Analysis of Genotypic Diversity in the Volatile Fraction and Aroma-Contributing Compounds of *Capsicum* Fruits from the *annuum-chinense-frutescens* Complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4388-4400, 2010.

ROMAN, A.L.C. **As pimentas *Capsicum* L. no cotidiano de uma comunidade de Várzea (Rio Amazonas), Santarém, Pará, Brasil**. 2010. 456p. Tese (Doutorado em Horticultura) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu-SP, 2010.

ROSSATO, M.; SANTIAGO, T.R.; LOPES, C.A. Reaction of *Capsicum* peppers commercialized in the Federal District to bacterial wilt. **Horticultura Brasileira**, v. 36, p. 173-177, 2018.

RUFINO, J.L.S.; PENTEADO, D.C.S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário**, v. 27, p.7-15, 2006.

RUIZ-LAU, N.; MEDINA-LARA, F.; MINERO-GARCÍA, Y.; ZAMUDIO-MORENO, E.; GUZMÁN-ANTONIO, A.; ECHEVARRÍA-MACHADO, I.; MARTÍNEZ-ESTÉVEZ, M. Water deficit affects the accumulation of capsaicinoids in fruits of *Capsicum chinense* Jacq. **HortScience**, v. 46, p. 487-492, 2011.

SÁNCHEZ-CHÁVEZ, E.; SILVA-ROJAS, H.V.; LEYVA-MIR, G.; VILLARREAL-GUERRERO, F.; JIMÉNEZ-CASTRO, J.A.; MOLINA-GAYOSSO, E.; GARDEA-BÉJAR, A.A.; ÁVILA-QUEZADA, G.D. An effective strategy to reduce the incidence of *Phytophthora* root and crown rot in bell pepper. **Interciencia**, v. 42, p. 229-235, 2017.

SANTOS, F.S.; PACHECO, L.G.A. Teste de DHE. In: **Proteção de cultivares no Brasil**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 161-167, 2011.

SANTOS, F.S.; AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F.; MACHADO, R.Z.; ARAÚJO, S.P. Evolution, importance and evaluation of cultivar protection in Brazil: the work of the SNPC. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, S2, p. 99-110, 2012.

SCHOLTHOF, K.B.G.; ADKINS, S.; CZOSNEK, H.; PALUKAITIS, P.; JACQUOT, E.; HOHN, T.; HOH, B.; SAUNDERS, K.; CANDRESSE, T.; AHLQUIST, P.; HEMENWAY, C.; FOSTER, G.D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p.938–954, 2011.

SIGNORINI, T.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S.; BESPALHOK, D.N.; MONTEIRO, E.R. Diversidade genética de espécies de *Capsicum* com base em dados de isozimas. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 534-539, 2013.

SILVA, D.J.H.; MOURA, M.C.C.L.; CASALI, V.W.D. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta. **Horticultura Brasileira**, v. 19, p. 108-114, 2001.

SILVA, L.R.A.; RODRIGUES, R.; PIMENTA, S.; CORREA, J.W.S.; ARAÚJO, M.S.B.; BENTO, C.S.; SUDRÉ, C.P. Inheritance of bacterial spot resistance in *Capsicum annuum* var. *annuum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-11, 2017.

SOUSA, T.V.; CAIXETA, E.T.; ALKIMIM, E.R.; OLIVEIRA, A.C.B. Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. **Euphytica**, v. 213, p. 2-15, 2017.

TANKSLEY, S. D. High rates of cross-pollination in chile pepper. **HortScience**, v. 19, p. 580-582, 1984.

TEODORO, A.F.P.; ALVES, R.B.N.; RIBEIRO, L.B.; REIS, K.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.P.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Vitamin C content in Habanero pepper accessions (*Capsicum chinense*). **Horticultura Brasileira**, v.31, p. 59-62, 2013.

THOMAZ, L.F. O nome das especiarias. In: GUERREIRO, I. (Coord.). **A epopéia das especiarias**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1999. p. 8-41.

TOPPA, E.V.B.; JADOSKI, C.J. O Uso dos Marcadores Moleculares no melhoramento Genético de Plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, p. 1–5, 2013.

ULHOA, A.B.; PEREIRA, T.N.; SILVA, R.N.; RAGASSI, C.F.; RODRIGUES, R.; PEREIRA, M.G.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Caracterização molecular de linhagens de pimenta do tipo Jalapeño amarelo. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 35-40, 2014.

UPOV (2017) **União Internacional para a proteção de obtenções vegetais**. Disponível em: <https://www.upov.int/export/sites/upov/members>, em 23/10/2019.

VÁZQUEZ, P.; CORTEZ, M.C.N. Use of organic alternatives in the production system of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) under greenhouse

conditions. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, p. 1091-1094, 2018.

VIÑALS, F.N.; ORTEGA, R.G.; GARCÍA, J.C. **El cultivo de pimientos, chiles e ajies**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1996. 607p.

WAHYUNI, Y.; BALLESTER, A.; TIKUNOV, Y.; VOS, R.C.H.; PELGROM, K.T.B.; MAHARIJAYA, A.; SUDARMONOWATI, E.; BINO, R.J. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. **Metabolomics**, v. 9, p.130–144, 2013.

WILKINSON, J.; CASTOLDI, P.G. **A transnacionalização da indústria de sementes no Brasil: biotecnologias, patentes e biodiversidade**. Rio de Janeiro, RJ: ActionAid Brasil, 2000. 141p.

CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO BASE DE PIMENTA HABANERO COM BASE EM CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E MARCADORES SSR

RESUMO

O tipo morfológico Habanero é composto por um grupo de pimentas com representativa variação quanto às características relacionadas à parte vegetativa, folhas, flores e, principalmente, frutos. Uma população base de pimenta Habanero, oriunda do intercruzamento de acessos contrastantes morfolologicamente, foi estabelecida pela Embrapa Hortaliças. O estudo da variabilidade genética presente nesta população base representa importante fonte de informação para o atual e futuros programas de melhoramento genético da instituição. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a variabilidade genética presente na população base, bem como nos acessos genitores de pimenta Habanero, estabelecida pela Embrapa Hortaliças por meio de descritores morfológicos e marcadores microssatélites. Foram avaliadas 144 plantas da população base, além de 30 acessos parentais, através de 45 descritores morfológicos recomendados pela *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) e por meio de 26 marcadores microssatélites (SSR). A variabilidade genética entre parentais e população base foi estimada por meio das matrizes de distâncias genéticas tanto para os caracteres morfológicos quanto para os marcadores SSR e as análises de agrupamento foram realizadas por meio de dendrogramas, utilizando como critério de agrupamento o método do UPGMA. Do total de descritores avaliados, 39 caracteres apresentaram duas ou mais categorias de classificação. Cerca de 26% dos descritores morfológicos apresentaram quatro ou mais categorias, sendo que cor do fruto maduro e forma do fruto apresentaram mais de seis níveis de classificação. Aproximadamente 16% e 13% das plantas da população e dos acessos parentais, respectivamente, foram considerados precoces. Nos descritores cor do fruto maduro, forma do fruto e comprimento de fruto foram observadas categorias que só estavam presentes na população base, ou seja, possivelmente ocorreu segregação

transgressiva para estas características. Houve a formação de 30 grupos de similaridade através do método UPGMA para os descritores morfológicos e 18 grupos para os marcadores SSR. Um total de 125 alelos foi observado entre os acessos parentais e plantas da população base a partir dos *loci* SSR e o conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) foi de 0,566, indicando que os *primers* SSR são classificados como satisfatórios em conteúdo informativo. A elevada variabilidade genética encontrada entre os acessos genitores e entre as plantas da população base, através dos descritores morfológicos e marcadores SSR, representa importante fonte de recursos genéticos para o atual e também para os futuros programas de melhoramento genético de pimenta Habanero da Embrapa Hortaliças.

Palavras-chave: *Capsicum chinense*, diversidade, segregação transgressiva, melhoramento genético.

GENETIC VARIABILITY OF A BASE POPULATION OF HABANERO PEPPER USING MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND SSR MARKERS.

ABSTRACT

Habanero pepper is composed of a group of peppers with a representative variation in characteristics related to the vegetative part, leaves, flowers and, mainly, fruits. Embrapa Hortaliças established a base population of Habanero pepper, originated from the intercrossing of contrasting accessions. The study of the genetic variability present in this base population represents an important source of information for the current and future genetic improvement programs. The present study aimed to estimate the genetic variability in a sample of 144 genotypes from the base population, as well as in the parent accessions of Habanero pepper, through morphological characteristics and microsatellite markers. 144 plants from the base population and 30 parental accessions were evaluated through 45 morphological descriptors recommended by the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and through 26 pairs of microsatellite primers (SSR). The genetic variability between parents and the

base population was estimated through the genetic distances matrices for both morphological characters and SSR markers and the cluster analyzes were performed using dendrograms, using the UPGMA method as the clustering criterion. 39 characters presented two or more classification categories. About 26% of the morphological descriptors had four or more categories. Color of the ripe fruit and the shape of the fruit showing more than six levels of classification. Approximately 13% and 16% of the base population plants and parental accesses, respectively, were considered early. The descriptors color of the ripe fruit, fruit shape and fruit length presented possible transgressive segregation. Thirty similarity groups were formed using the UPGMA method for the morphological descriptors and 18 groups for the SSR markers. A total of 125 alleles were observed between parental accessions and base population plants from the SSR loci and the average polymorphic information content of (PIC) was 0.566. The high genetic variability found between parent accesses and between plants of the base population, through morphological descriptors and SSR markers, represents an important source of genetic resources for the current and for future Embrapa's Hortaliças breeding programs.

Keywords: *Capsicum chinense*, diversity, transgressive segregation, plant breeding.

1 INTRODUÇÃO

A pimenta (*Capsicum* spp.) é uma das hortaliças mais importantes mundialmente, devido à sua alta versatilidade de aplicações na indústria, culinária e ornamentação (ZHANG et al., 2016; MOREIRA et al., 2018). No Brasil, a pimenta faz parte da cultura de várias comunidades e também representa um valioso recurso genético (BABA et al., 2016).

O gênero *Capsicum* apresenta ampla variabilidade morfológica, principalmente em termos de cor, tamanho, forma e nível de pungência (CARDOSO et al., 2018). Mais de 30 espécies são descritas para o gênero, 13 das quais estão presentes no Brasil (RIBEIRO et al., 2020).

Cinco espécies de *Capsicum* são cultivadas, sendo a distinção entre elas realizada com base em suas características de flores e frutos (KIM et al., 2014, GARCÍA et al., 2016). Dentre as espécies cultivadas, *C. chinense* é considerada a mais brasileira, tendo como centro de diversidade a Bacia Amazônica (POZZOBON et al., 2015).

Diversos tipos morfológicos são descritos dentro da espécie *C. chinense* em decorrência da elevada variabilidade genética, evidenciada principalmente nos frutos, que podem ter diferentes formatos, colorações e níveis de pungência, destacando-se as pimentas conhecidas como pimenta-de-cheiro, cumari-do-Pará, biquinho e Habanero (RIBEIRO et al., 2020).

O tipo morfológico Habanero é composto por um grupo de pimentas com representativa variação quanto às características relacionadas a parte vegetativa, folhas, flores e, principalmente, frutos (CASTRO-CONCHA et al. 2014; PENÃ-YAM et al., 2019). O fruto de Habanero pode variar de 2,9 a 6,0 cm de comprimento por 2,5 a 4,6 cm de largura, 7 a 12 g de massa e o nível de pungência de 5.000 a 700.000 unidades Scoville (SHU). Quando imaturos, são verdes, passando para marfim, amarelo, laranja, vermelho, marron ou roxo, quando maduros (CROSBY et al., 2013; REIFSCHNEIDER et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015).

A pimenta Habanero é cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais (TEODORO et al. 2013), com destaque para a região de Yucatán, no México (BOSLAND & COON 2015), onde a produtividade pode alcançar 40 t

ha⁻¹ (VÁZQUEZ & CORTEZ, 2018).

A diversidade presente dentro do tipo varietal Habanero no Brasil é um indicativo do seu grande potencial para uso em programas de melhoramento. Nass et al. (2015) ressaltam que o sucesso dos programas de melhoramento depende da variabilidade genética disponível. Diversos métodos são utilizados com o objetivo de ampliar a variabilidade, destacando-se a metodologia de intercruzamento multiparental e estabelecimento de populações base (HUANG et al., 2015). São várias as vantagens de se desenvolver uma população de base genética ampla, destacando-se o estímulo à interação entre bancos de germoplasma e programas de melhoramento, aumentando-se as chances de utilização dos acessos, bem como da possibilidade de se explorar recombinações genéticas e associações de múltiplos alelos, originados do intercruzamento entre acessos (BANDILLO et al., 2013; NASS et al., 2015). Além disso, o estabelecimento de uma população base bem estruturada se torna fonte de recursos genéticos com potencial para seleção de novas cultivares por diversos anos (RIBEIRO et al., 2020).

Parte da diversidade genética do gênero *Capsicum* é mantida em bancos de germoplasma em inúmeras instituições brasileiras e internacionais (RIBEIRO et al., 2020). A Embrapa Hortaliças é o braço da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), subordinada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, responsável pelas culturas olerícolas. Esta unidade de pesquisa abriga o maior banco de germoplasma do gênero *Capsicum* da América do Sul, que está entre os maiores do mundo, atualmente composto por quatro mil acessos (RIBEIRO et al., 2020).

Recentemente, uma população base de pimenta Habanero foi estabelecida pela Embrapa Hortaliças a partir do intercruzamento de 31 acessos contrastantes morfológicamente provenientes de diferentes regiões. Esta população base apresenta elevada variabilidade, observada na diversidade de características morfológicas de frutos, flores e parte vegetativa, bem como no teor de capsaicina (NASS et al., 2015). Essa diversidade representa a principal fonte de recursos genéticos para os atuais e futuros programas de melhoramento de Habanero da Embrapa Hortaliças (NASS et al.,

2016).

A avaliação da variabilidade genética da população base mostra-se de suma importância, principalmente quando se busca obter conhecimento sobre a sua base genética, assim como auxiliar a tomada de decisão quanto à seleção de genótipos com características promissoras, como por exemplo, resistência a pragas e doenças, caracteres morfoagronômicos e bioquímicos, entre outras características.

A avaliação da variabilidade de germoplasma, populações melhoradas e/ou genótipos avançados é comumente baseada em descritores fenotípicos e genotípicos (CARDOSO et al., 2018). Para *Capsicum*, a caracterização fenotípica é normalmente realizada utilizando-se descritores morfológicos multicategóricos e quantitativos estabelecidos pelo então *International Plant Genetic Resources Institute*-IPGRI, hoje *Bioversity International* (CARVALHO et al., 2014). O uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética de pimentas é relatado em vários trabalhos, com destaque para marcadores do tipo AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphism* (GELETA et al., 2006; AKTAS et al., 2009; ALBRECH et al., 2012), RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* (THUL et al., 2012; BAHURUPE et al., 2013) e, recentemente, os marcadores microssatélites ou SSR (CARVALHO et al., 2017). Buso et al., (2016) descrevem os marcadores SSR como altamente responsivos, pois apresentam alto poder discriminatório, herança codominante, além de serem multialélicos e mais estáveis.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou estimar a variabilidade genética em 144 genótipos da população base de pimenta Habanero estabelecida pela Embrapa Hortaliças por meio de características morfológicas e marcadores microssatélites de forma a dar suporte a futuras ações de melhoramento genético com uso desse germoplasma.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material e local

Amostras de 30 dos 31 acessos genitores (Tabela 1), bem como de 144 genótipos F₂ da população base, oriundos do intercruzamento entre os acessos

genitores e autofecundação das plantas F₁, foram avaliadas quanto aos caracteres morfológicos e também com base em marcadores microssatélites. A caracterização de um dos acessos parentais (CNPH 4.256) não foi realizada devido à impossibilidade de obtenção de plantas para o presente estudo.

Tabela 1. Descrição quanto à origem, pungência e aroma de acessos genitores de pimenta Habanero utilizados em intercruzamentos para obtenção de uma população base. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Identificação BAG (CNPH)	Origem/procedência	Pungência	Aroma
780	Mato Grosso do Sul	Alta	Alto
2.825	Distrito Federal	Alta	Alto
2.850	Acre	Média	Baixo
2.851	Acre	Média	Baixo
3.040	Distrito Federal	Média	Alto
3.188	Cia Burpee® (EUA)	Alta	Alto
3.222	Tocantins	Alta	Alto
3.234	Distrito Federal	Média	Alto
3.269	Maranhão	Alta	Baixo
3.272	Maranhão	Alta	Médio
3.278	Maranhão	Alta	Alto
3.375	Distrito Federal	Baixa	Médio
3.471	Maranhão	Alta	Alto
3.480	Amazonas	Alta	Alto
3.522	Amazonas	Alta	Baixo
3.573	Amazonas	Alta	Médio
3.627	México	Média	Baixo
3.864	Pernambuco	Alta	Alto
3.871	México	Alta	Baixo
3.937	Minas Gerais	Alta	Médio
4.137	São Paulo	Alta	Alto
4.152	Topseed®(Brasil)	Alta	Alto
4.160	Topseed® (Brasil)	Alta	Alto
4.214	Chile Pepper Institute (EUA)	-	-
4.215	Chile Pepper Institute (EUA)	-	-
4.218	Chile Pepper Institute (EUA)	-	-
4.219	Chile Pepper Institute (EUA)	-	-
4.253	Whatcom seed Co (EUA)	-	-
4.254	Whatcom seed Co (EUA)	-	-
4.255	Whatcom seed Co (EUA)	-	-
4.256	Reimer Seeds (EUA)	-	-

- informações não obtidas

A caracterização morfológica foi realizada em casa de vegetação, localizada em Brasília, Distrito Federal, Brasil, 15°55'59.8" W e 48°08'34.2" S, com altitude de 990 m, no período de janeiro a julho de 2018. A genotipagem dos genitores e plantas F₂ utilizando-se marcadores SSR foi realizada no

Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília, Distrito Federal.

As sementes dos acessos genitores e das plantas F₂ foram germinadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato orgânico e Osmocote® (a base de NPK 18-5-9 e micronutrientes) em casas de vegetação com telas anti-afídicas e, após 45 dias, as mudas de cada genótipo foram transplantadas para o solo, também sob casa de vegetação, dispostas em espaçamento de 0,60 m entre plantas e 1,0 m entre fileiras.

A adubação foi realizada de acordo com a análise química do solo seguindo-se as recomendações para a cultura de pimenta na região do Distrito Federal, propostas por Alcântara & Ribeiro (2008). Pulverizações para controle de pragas foram realizadas sempre que necessárias. A irrigação foi realizada via gotejamento, com frequência diária e o cultivo realizado conforme o recomendado para sistemas de produção de pimentas *Capsicum* (RIBEIRO et al., 2008).

2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada utilizando-se 45 descritores de parte vegetativa (plântula, haste e folha) e reprodutiva (flor, fruto e semente) recomendados por IPGRI (1995) para *Capsicum* (Tabela 2).

Foram avaliadas cinco plantas de cada acesso parental e 144 plantas F₂ da população base.

Tabela 2. Descritores morfológicos para *Capsicum* (IPGRI, 1995).

Parte vegetativa	Inflorescência	Frutos e sementes
1. Cor do hipocótilo	17. N° de flores por axila	27. Manchas de antocianina
2. Cor da folha cotiledonar	18. Posição da flor	28. Cor do fruto imaturo
3. Cor da haste	19. Cor da corola	29. Intensidade da cor do fruto imaturo
4. Antocianina nodal	20. Forma da corola	30. Cor do fruto maduro
5. Forma da haste	21. Cor da antera	31. Formato do fruto
6. Pubescência da haste	22. Cor do filamento	32. Forma na união com o pecíolo
7. Comprimento da haste	23. Posição do estigma	33. Ombro do fruto
8. Diâmetro da haste	24. Pigmentação do cálice	34. Forma do ápice do fruto
9. Brotação abaixo da primeira bifurcação	25. Margem do cálice	35. Apêndice do fruto
10. Hábito de crescimento	26. Dias para início do florescimento	36. Superfície do fruto
11. Densidade da folhagem		37. Persistência do fruto
12. Comprimento da folha		38. Comprimento do fruto
13. Diâmetro da folha		39. Largura do fruto
14. Cor da folha		40. Espessura da parede
15. Forma da folha		41. Comprimento do pedúnculo
16. Pubescência da folha		42. Enrugamento transversal
		43. N° de lóculos
		44. N° sementes
		45. Peso do fruto

2.3 Caracterização molecular

Amostras de folíolos de uma planta de cada um dos genitores e das plantas da população base foram coletadas e o DNA genômico extraído por meio do método cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 2% (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% e também por espectrofotometria (*Nanodrop 2000*; *Thermo Fisher Scientific*) e cada amostra foi diluída para 3,0 ng/μl.

Reações de amplificação de amostras de DNA de cada acesso foram realizadas utilizando-se 26 pares de *primers* SSR desenvolvidos no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Tabela 3; CARVALHO et al., 2015; BUSO et al., 2016). As reações foram realizadas em volume total de 10 μl composta pela seguinte combinação de reagentes: 5,55 μl de água MilliQ; 1,0 μl de tampão 10X; 0,3 μl de MgCl₂ 50 mM; 0,8 μl de dNTPs 2,5 mM cada; 0,8 μl de BSA 2,5 mg/ml, 0,3 μl de *primer* a 5 μM

marcados com fluorescências 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarela); 0,25 µl de enzima Taq polimerase (5 U/µl) e mais 3 µl de DNA genômico a 3 ng/µl. As reações de amplificação ocorreram da seguinte forma: 95 °C por 15 min para desnaturação, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min à 56 °C para anelamento e 1 min a 72 °C e, ao final, uma extensão de 72 °C por 10 min.

As reações foram preparadas para genotipagem em sequenciador automático modelo ABI 3730 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) misturando-se 1 µL da reação de PCR a 10 µl do agente desnaturante formamida (HiDi) e 1 µl do padrão de peso molecular (ROX). A mistura foi então desnaturada por 5 minutos a 95 °C.

A identificação dos alelos a partir dos dados do sequenciador foi feita manualmente pela demarcação dos picos de fluorescência com auxílio do *software* GeneMapper versão 4.1 (*Applied Biosystems*), sendo o arredondamento do tamanho dos alelos realizado por meio do *software* AlleloBin (PRASANTH et al., 2006). Por fim, obteve-se uma planilha eletrônica com a identificação do(s) alelo(s) presentes em cada um dos 26 *loci* SSR em cada planta analisada.

2.4 Análise estatística

Os descritores quantitativos da população base e dos acessos genitores foram utilizados para avaliar a distribuição de classes e a amplitude dos valores com o auxílio do *software* Excel 2010.

Os dados da caracterização morfológica que compreenderam características qualitativas (multicategóricas) e quantitativas (divididas em classes pré-definidas de acordo com a amplitude entre os valores máximo e mínimo) foram utilizados para estimar a distância genética entre os genótipos de acordo com a Distância Euclidiana Média Padronizada - DEMP (STEEL & TORRIE, 1980).

A matriz de distâncias genéticas entre os genótipos (30 acessos e 144 plantas F₂) foi utilizada para realizar as análises de agrupamento, utilizando-se como critério o método UPGMA (unweighted pair-group method arithmetic average), com auxílio do Programa PAST 3.14. (HAMMER et al., 2001)

Para cada um dos 26 pares de *primers* SSR foram estimados o número de alelos efetivos, o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e os parâmetros populacionais de heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*) (Tabela 3), por meio do *software Cervus* (MARSHALL et al., 1998).

A matriz de distâncias genéticas obtidas a partir dos *loci* microssatélites foi calculada com auxílio do Programa PAST 3.14 (Hammer et al., 2001), com base na seguinte fórmula:

$$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$$

sendo:

DG_{ij} = Distância genética entre os acessos i e j;

NLC = Número de Locos Coincidentes;

NTL = Número Total de locos.

O NLC representa o somatório das coincidências alélicas dos *loci* avaliados, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (ausência alelo coincidente).

Com base na matriz de distâncias genéticas, foi realizada análise de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se como critério de agrupamento o método UPGMA, com auxílio do Programa PAST 3.14 (HAMMER et al., 2001).

A significância da associação entre as matrizes de distância obtidas por caracteres morfológicos e por marcadores SSR foi estimada com base no teste de correlação de Mantel (MANTEL, 1967) e teste t, também por meio do programa NTSYS pc 2.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 45 descritores morfológicos utilizados na caracterização das plantas F₂ da população base e dos acessos genitores (Tabela 2), 39 descritores apresentaram duas ou mais categorias de classificação e apenas seis descritores mostraram-se monomórficos para todos os genótipos avaliados: forma do caule (ereto), pubescência da folha (esparsa), posição da flor (intermediária), cor da corola (esverdeada), margem do cálice

(intermediária) e cor do fruto imaturo (verde). Os descritores monomórficos são invariáveis e, portanto, incapazes de discriminar acessos dentro do grupo Habanero, podendo ser eliminados em futura caracterização intraespecífica. Posição da flor e cor do fruto imaturo são alguns dos descritores mínimos relatados para *C. chinense* (SILVA et al., 2013); no entanto, esses descritores não possuíam capacidade discriminativa quando aplicados para distinguir acessos de pimenta Habanero. Carvalho et al. (2017) também verificaram que a posição da flor foi ineficaz na diferenciação de acessos de *C. frutescens*. Baral & Bosland (2004) destacam que alguns descritores relacionados à inflorescência são utilizados para diferenciar espécies de *Capsicum*, como a posição da flor e a presença de constrição anelar do cálice, usadas para distinguir entre *C. frutescens* e *C. chinense*.

Os descritores cor do fruto maduro, forma do fruto, dias para florescimento, largura da folha, comprimento da folha, peso médio do fruto, comprimento do fruto, largura do fruto, espessura do pericarpo, comprimento da haste, diâmetro da haste e comprimento do pecíolo variaram sensivelmente entre os genótipos avaliados, sendo classificados em cinco ou mais categorias de distinção. Os demais descritores apresentaram de duas (presente ou ausente) a quatro categorias de diferenciação e corresponderam a cerca de 35% do total de descritores estudados.

Para o descritor morfológico cor do fruto maduro, observaram-se a variação em nove categorias de classificação, sendo que as cores vermelho e vermelho escuro representaram, juntas, 43,3% e 63,2% do total de acessos parentais e genótipos da população base avaliados, respectivamente (Figura 1A). Frutos de cor vermelha são amplamente utilizados pela indústria na produção de molhos e flocos, bem como para pimenta pápricas para o processo de coloração de alimentos (RIBEIRO et al., 2017). As pimentas de coloração vermelha também apresentam importância funcional, sendo ricas em carotenoides, com destaque para capsantina, β -caroteno, α -caroteno, zeaxantina e β -criptoxantina (GIUFFRIDA et al., 2013; GÓMEZ-GARCÍA & CHOA-ALEJO, 2013). Wall et al. (2001) obtiveram teor de carotenoides totais

em frutos vermelhos de pimenta Habanero de $446 \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto que esse teor foi de $13 \mu\text{g g}^{-1}$ para frutos alaranjados.

Seis níveis de classificação foram observados quanto à forma do fruto (Figura 1B), dos quais frutos, campanulados e campanulados e em bloco se sobressaíram tanto para os genitores quanto para as plantas da população base, representando 33,4% e 41,6%, respectivamente. O formato campanulado é tido como o mais comum em frutos de pimenta Habanero (Ribeiro et al., 2015).

A característica dias para florescimento (Figura 1C), estreitamente relacionada à precocidade, apresentou cinco níveis de classificação, sendo que 13,3% e 16,0% dos acessos parentais e plantas F_2 , respectivamente, se agruparam na categoria 1 (64-67 dias), sendo assim, considerados precoces. Plantas da população base classificadas como precoces foram consideradas promissoras para seleção e inclusão no programa de melhoramento de Habanero.

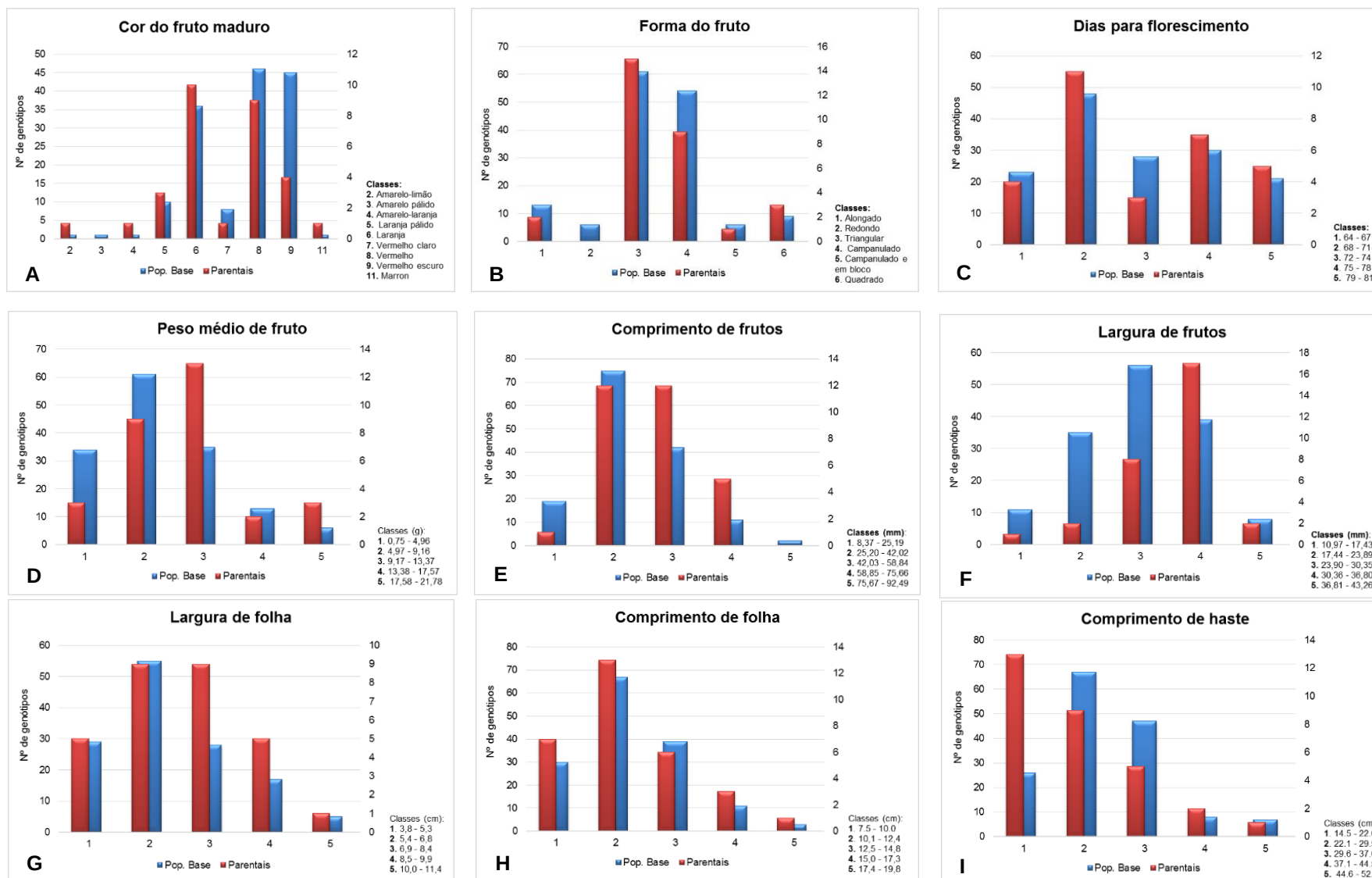


Figura 1. Distribuição de 30 acessos genitores e 144 genótipos F₂ de pimenta Habanero em classes de nove características morfológicas. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Quanto às características quantitativas de frutos: peso médio, comprimento e largura de frutos observaram-se variações em cinco categorias, sendo que as maiores médias tanto para os acessos parentais quanto para a população foram observadas nas categorias 2 e 3 para peso e comprimento de fruto e 3 e 4 para largura de fruto (Figura 1D; E; F). Aproximadamente, 4,2%, 1,5% e 5,5% de plantas da população base se agruparam na categoria máxima (5) de peso, comprimento e largura de frutos, respectivamente. Estas plantas também foram consideradas no processo de seleção como sendo promissoras, pois foram superiores aos valores observados por Ribeiro et al (2015).

As características relacionadas a peso médio, comprimento e largura de frutos estão relacionadas à produtividade, ou seja, se um genótipo apresenta frutos com peso, comprimento e largura superiores, provavelmente possui alta produtividade e, conseqüentemente, é promissor para inclusão em um programa de melhoramento. Ribeiro et al. (2015) relatam que um fruto de pimenta Habanero pesa, em média, de 7 a 12 g e possui de 2,9 a 6,0 cm de comprimento por 2,5 a 3,6 cm de largura. Foram obtidos, no presente estudo, frutos da população base com peso variando de 17,6 a 21,8, comprimento entre 7,5 a 9,2 cm e largura de 3,7 a 4,3 cm. Comprimento de haste, largura e comprimento de folhas também apresentaram cinco classes de distinção (Figura 1 G; H; I).

Para os descritores cor do fruto maduro, forma do fruto e comprimento de fruto, foram observadas categorias que só estavam presentes na população base, ou seja, são discrepantes quando comparados aos observados nos acessos parentais, como por exemplo, frutos com coloração amarelo pálido (2), forma arredondada (1) e com variação de 75,67 a 92,49 mm de comprimento (5).

Ao se avaliar a amplitude dos valores originais dos descritores quantitativos (Figura 2), observou-se que para comprimento de frutos há considerável discrepância entre os acessos parentais e a população base, com valores entre 8 a 93 cm e 22 a 72 cm, respectivamente.

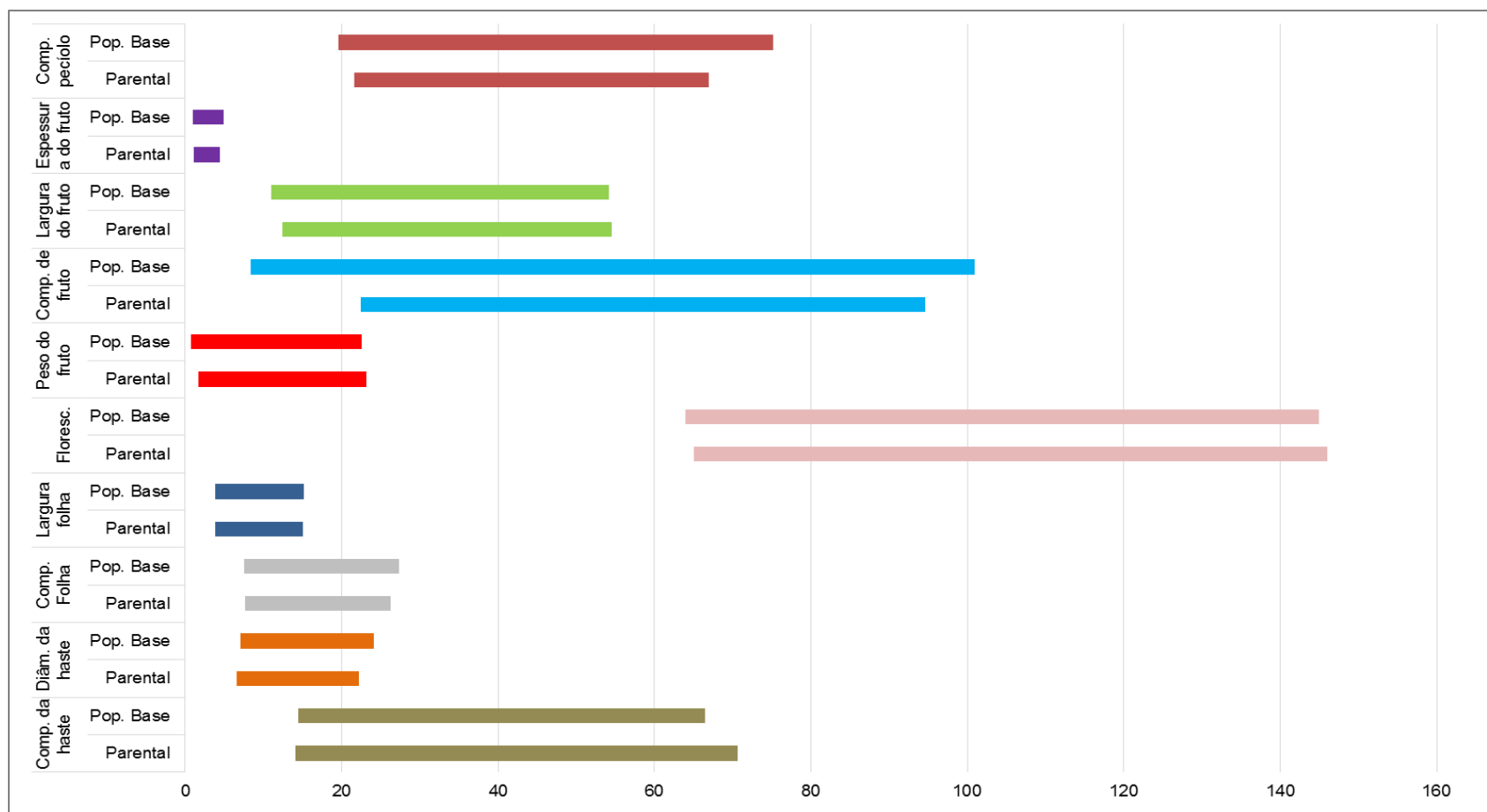


Figura 2. Amplitude de valores observados para as características morfológicas quantitativas: comprimento da haste (cm), diâmetro da haste (mm), comprimento da folha (cm), largura da folha (cm), florescimento (dias), peso do fruto (g), comprimento do fruto (mm), largura do fruto (mm); espessura do fruto (mm) e comprimento do pecíolo (mm), em uma população base de 144 plantas (geração F₂) em comparação com os parentais (30 acessos) de pimenta Habanero. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Amplitude superior para comprimento do pecíolo e comprimento do fruto foi observada na população base em comparação ao conjunto de acessos genitores (Figura 2), o que pode estar relacionado a possível segregação transgressiva na população F_2 . Wesp et al. (2008), definem a segregação transgressiva como o aparecimento, em gerações segregantes, de indivíduos que estão fora do intervalo dos genitores no que se refere a dada característica. A ocorrência de segregação transgressiva é considerada comum em cruzamentos inter e intraespecíficos, principalmente quando se utiliza genitores de ampla diversidade (WANG et al., 2012), como o observado no presente estudo. Vicente & Tanksley (1993) afirmam que a transgressão interespecífica é significativa em relação ao melhoramento genético, pois representa fonte potencial de novas variações genéticas. Alimi et al. (2013) observaram segregação transgressiva para a característica peso médio de frutos em uma população de *C. annuum*. Nascimento et al. (2019) descrevem a ocorrência de segregação transgressiva em uma população F_2 de *C. annuum* para os descritores morfológicos: largura de folha, dias para florescimento e produção de sementes por fruto.

No dendrograma gerado a partir da caracterização com descritores morfológicos (Figura 3), trinta grupos de similaridade genética foram formados. O elevado número de grupos formados evidencia a alta variabilidade presente nos acessos genitores e na população base. O grupo I foi composto apenas pelo genótipo da população base CNPH 15.469, planta 45 (CNPH PB 45), sendo considerado o mais distante geneticamente dos acessos parentais e demais plantas da população base. Da mesma forma, o acesso CNPH 4254 se agrupou individualmente no extremo do dendrograma (grupo 30). Ao analisar estes materiais, observa-se que eles se diferenciam em 17 descritores polimórficos, ou seja, em 42,5% do total de caracteres avaliados, sendo considerados os mais distantes morfológicamente. Os acessos parentais CNPH 3664, CNPH 4255, CNPH 780 e CNPH 3278, bem como os genótipos da população base CNPH PB 105, CNPH PB 73, CNPH PB 35, CNPH PB 28 e CNPH PB 60 também formaram grupos individuais.

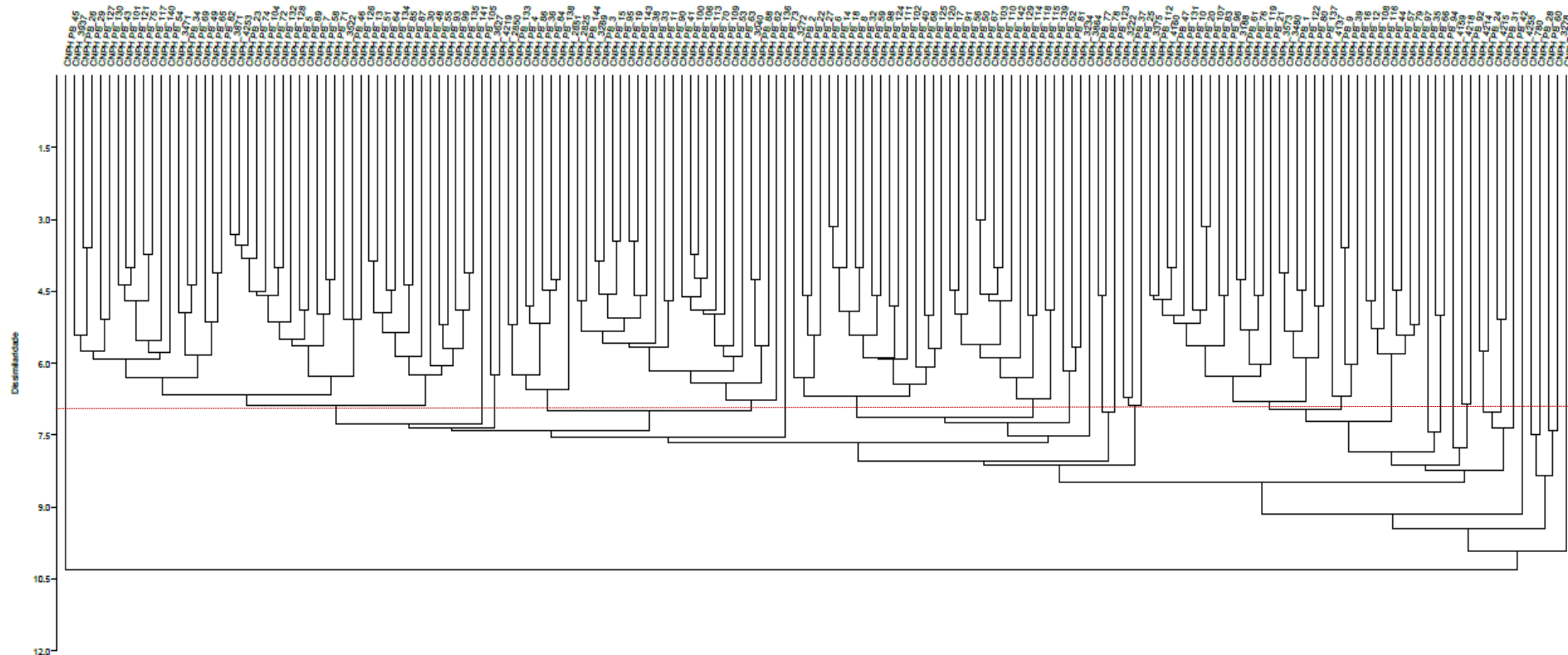


Figura 3. Análise de agrupamento por UPGMA de 30 acessos genitores e 144 genótipos da população base CNPH 15.469 (CNPH PB_) de pimenta Habanero com base em uma matriz de distâncias genéticas obtidas com uso de 45 descritores morfológicos. A formação dos grupos foi realizada a partir da linha de corte (em vermelho), em sentido crescente da esquerda para a direita no dendrograma. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Nos agrupamentos com mais de quatro genótipos (oito grupos) houve a presença de pelo menos um acesso parental, indicando similaridade morfológica entre parental e os genótipos da população base para o grupo formado, principalmente para características relacionadas à inflorescência. O grupo II, por exemplo, foi o maior e englobou cinco acessos parentais e 43 genótipos da população base. Neste grupo, nove descritores apresentaram resultados similares entre parentais e plantas da população. No grupo VI, segundo maior, foram reunidos três acessos genitores e 21 genótipos da população base, com cinco descritores similares.

A correlação entre a matriz de valores cofenético e a matriz de similaridade foi de 0,74, indicando bom ajuste entre a matriz e o gráfico.

Um total de 125 alelos foi encontrado a partir dos 26 *loci* SSR polimórficos entre os acessos parentais e plantas da população base. O número de alelos por *locus* variou de 3 a 7 com média de 4,80 (Tabela 3). O conteúdo de informação polimórfico (PIC) variou de 0,203 a 0,781. Os *loci* que apresentaram maior informação de polimorfismo foram: CA94, CA159 e CA169 com valores de 0,733; 0,772 e 0,781, respectivamente.

Segundo Botstein et al. (1980), os marcadores moleculares são classificados como satisfatórios em conteúdo informativo quando apresentam PIC superior a 0,5, mediamente informativos com valores que vão de 0,25 a 0,5 e pouco informativo com valores inferiores a 0,25. Seguindo essa classificação, a maior parte dos marcadores moleculares do presente trabalho é tida como altamente informativa (20 marcadores), os demais são mediamente informativos (quatro marcadores) e pouco informativos (dois marcadores). Nos *loci* CA10; CA26; CA163 e CA 199, a Heterozigosidade observada (H_o) foi de 0,651; 0,770; 0,798 e 0,667 correspondendo a 65%, 77%, 79% e 66 % de indivíduo heterozigotos.

Tabela 3. *Primers* microssatélites utilizados na análise de 30 acessos genitores e 144 plantas F₂ de pimenta Habanero, adaptado de Carvalho et al. (2015); Buso et al., (2016). Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Primers (CA)	Forward/ Reverse ²	Nº de Alelos	Tamanho (bp) ³	He ⁴	Ho ⁵	PIC ⁶
10	AAACACGAGAGAGAGAGA CGAGTGTGGTGAATATGA	5	116-140	0,694	0,651	0,652
11	GTTGTTATCTCCTTTTCCCA AAATGTTAGGAACTCACCAG	3	90-95	0,648	0,243	0,591
26	CGCATATAGGCAGATCAAAT TGAATCAAATGCTCTCTGAA	5	116-124	0,651	0,770	0,603
29	TGGGTAAAGGTACTTAGTAG GTTGTATTGCTTTAGCTCAG	6	130-140	0,785	0,404	0,749
49	CTATCTTCGCATATAGGCAG AATCTCTGTGGCTGACTCAA	3	146-150	0,215	0,106	0,203
62	CGCATATAGGCAGATCAAAT GGTCAGACTACGCTCTCTCA	3	84-88	0,258	0,082	0,236
80	CTCAAGTGTGCCAGGTGATT GAGAGACAGGAAGAGACGTAC	5	118-138	0,467	0,543	0,384
82	GCACATGCACGTACAACC GGGGTAAAAGGCATTGTG	4	150-156	0,723	0,279	0,672
88	AATGGATGTTCCCTTGCTTT CAACTGATCAACCAATCCGT	4	170-180	0,668	0,287	0,602
90	AAGGAGGAACAAGAACAACC ATTGGCAAGCACATGTAAC	4	100-116	0,581	0,098	0,500
94	ACACAAAATGTCCCGGAA CCATTGACAAGGACAATTCT	7	128-130	0,768	0,405	0,733
96	CGCATATAGGCAGATCAAAT AATCTCTGTGGCTGACTCAA	5	130-138	0,592	0,195	0,555
106	CGAGGAAGCATTTAATGAGA AAATGTTAGGAACTCACCAG	5	150-158	0,549	0,333	0,510
110	GTCCAGTTTATGTTAGTTATTATGG TTCTTGATTTCATATAG	3	102-106	0,384	0,158	0,348
136	GTGGACTAACAGACTCAACG CTGATGATGCAGAACATGAT	4	138-140	0,699	0,397	0,641
144	TAGAAACACAAAATGTCCCC CCATTGACAAGGACAATTCT	5	116-120	0,719	0,368	0,673
159	GCAGAAAATGGGTAAAGGTA ATTGCTTTAGCTCAGAATGG	7	110-118	0,803	0,477	0,772
163	ACTCACCAGAAACAGTTAGC TCTGCTCATATACACCTACA	6	156-180	0,629	0,798	0,558
167	CATTCTCTTCTTCTCAAACG CACGTCAATCTGTTGTGAAA	5	110	0,661	0,590	0,620
169	CTTTAGCTCAGAATGGTC TGGGTAAAGGTACTTAGTAG	6	100-106	0,811	0,436	0,781
178	CCCAACTCATTTAATTCCAC CACGTCAATCTGTTGTGAAA	6	156-180	0,636	0,322	0,591
199	CCGCTACGTTAGTATGTTAT GATGTAATAATGCATGGTGT	6	170-180	0,626	0,667	0,562
211	CCAGATATGCAGGATCAAAG CTCAAGTGTGCCAGGTGATT	4	140-154	0,463	0,368	0,430
215	GGCTCTTACCATTGACAAGG ACACAAAATGTCCCGGAA	4	130-138	0,674	0,161	0,612
243	CATTTGTGATCAGGGCATTT AATGTTGATGTTCCCTTGCTTT	5	110-124	0,597	0,316	0,523
262	TGAGTCTTGCTTTGTTCTGG GTAAAGGCCGCTCAATCTAC	5	106-120	0,675	0,279	0,629
Média	-	4,80	-	0,614	0,374	0,566

¹ Núcleo das sequências repetitivas que constituem o microssatélite; ² Sequência de nucleotídeos *Forward* e *Reverse* nos *primers* microssatélites; ³ Tamanho em pares de bases das sequências de microssatélites; ⁴ *He*: Heterozigosidade esperada; ⁵ *Ho*: Heterozigosidade observada; ⁶ PIC: Conteúdo informativo de polimorfismo

Carvalho et al. (2015) ao avaliarem oito acessos de *C. chinense* do BAG da Embrapa Hortaliças a partir de 36 *loci* SSR identificaram 119 alelos com

média de 2 a 5 alelos por *locus* e PIC que variou de 0,19 a 0,68. Observa-se que no presente trabalho foram obtidos elevados valores de número de alelos e PIC, quando comparados com os valores obtidos por Carvalho et al. (2015), demonstrando a alta variabilidade genética dos acessos parentais e da população base de pimenta Habanero.

A análise de agrupamento realizada conforme as distâncias genéticas obtidas a partir de marcadores SSR (Figura 4) apresentou nítida separação dos 30 acessos genitores e 144 plantas da população base em 18 grupos com alto valor de dissimilaridade genética.

A correlação entre a matriz de valores cofenético e a matriz de similaridade foi de 0,92, indicando excelente ajuste entre a matriz e o gráfico. O número de acessos por grupo variou de 1 (0,58%) a 61 (35,0%). Os grupos I e II foram formados pelo genótipo F₂ CNPH PB_100 e pelo acesso parental CNPH 4254, respectivamente. Os genótipos da população base CNPH 15.469, planta 48 (CNPH PB_48), planta 68 (CNPH PB_68) e planta 45 (CNPH PB_45) também formaram grupos individuais. Da mesma forma que na análise de agrupamento com descritores morfológicos, foi observado que os materiais CNPH 4254 e CNPH PB_45 apresentaram dissimilaridade para os marcadores SSR, sendo, portanto, considerados altamente distantes morfológica e geneticamente. O grupo X foi o maior e englobou 10 (33,3%) acessos parentais e 51 (35,4%) genótipos da população base. O grupo XII, segundo maior, foi composto por 13 (43,1%) acessos genitores e 34 (23,6%) plantas da população base.

Verificou-se correlação positiva ($r = 0,586$) e significativa pelo teste *t* entre as distâncias genéticas calculadas com base em 45 descritores morfológicos e nos marcadores moleculares SSR. A correlação foi considerada de magnitude intermediária, mostrando que as análises morfológicas e moleculares, embora estejam correlacionadas, não apresentam exatamente as mesmas informações e os mesmos agrupamentos. Carvalho et al. (2017) também observaram coeficiente de correlação de magnitude intermediária ($r = 0,579$) entre 30 descritores morfológicos e marcadores SSR ao avaliarem acessos de *C. frutescens*.

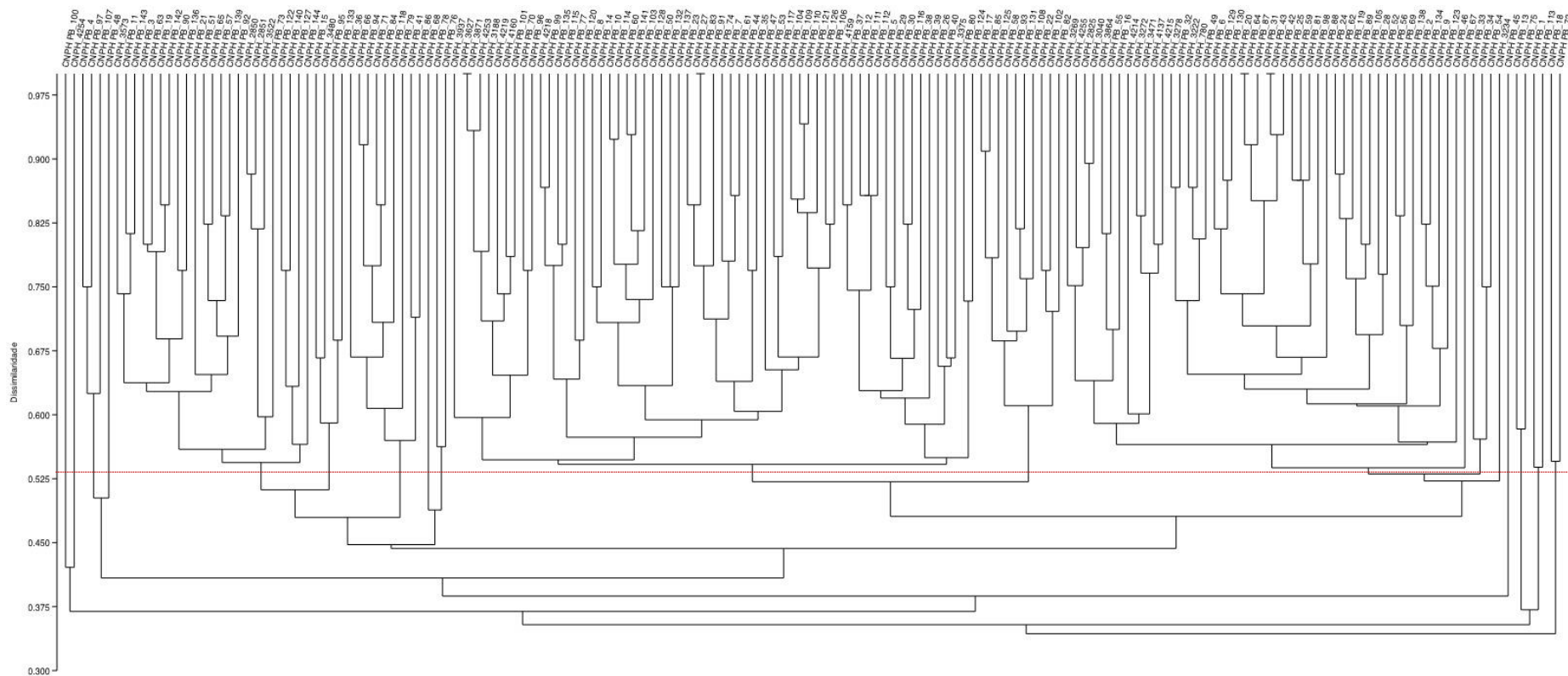


Figura 4. Análise de agrupamento de 30 acessos genitores e 144 genótipos F₂ de pimenta Habanero construído com base na matriz de distâncias genéticas utilizando-se 26 *loci* de marcadores moleculares microssatélites. A formação dos grupos foi realizada a partir da linha de corte (em vermelho), em sentido crescente da esquerda para a direita no dendrograma. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

A elevada variabilidade genética observada entre genótipos da população base (Figura 5) e entre os acessos genitores por meio de descritores morfológicos e marcadores SSR representa importante fonte de recursos genéticos que pode ser explorada de várias formas em programas de melhoramento genético. Nass et al., (2015) relatam que há diversas possibilidades para explorar essa variabilidade, como por exemplo, o uso da população base como fonte de linhagens e desenvolvimento de novas cultivares de pimenta Habanero para diversos nichos; manutenção da população para seleção em ambientes específicos; derivação de novas populações a partir da população base e, ainda, sua utilização em programas de seleção recorrente.



Figura 5. Variabilidade genética de frutos imaturos e maduros em uma população base de pimenta Habanero. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

4 CONCLUSÃO

Em 26% dos descritores morfológicos houve a formação de quatro ou mais categorias de classificação, com destaque para os descritores qualitativos cor do fruto maduro e forma do fruto, que apresentaram nove e seis categorias, respectivamente.

Os resultados sugerem que houve a ocorrência de segregação transgressiva para as características cor do fruto maduro, forma do fruto e comprimento de fruto, diâmetro de haste, espessura do fruto e comprimento de pecíolo.

Descritores morfológicos e marcadores moleculares do DNA se mostraram importantes e complementares na geração de informações de interesse do programa de melhoramento.

Elevada variabilidade genética foi observada na população base de pimenta Habanero através de descritores morfológicos e marcadores SSR. Esta população base representa importante fonte de recursos genéticos para o atual e futuros programas de melhoramento genético de pimenta Habanero.

5 REFERÊNCIAS

- AKTAS, H., ABAK, K., SENSOY, S. Genetic diversity in some Turkish pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes revealed by AFLP analyses. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 4378-4386, 2009.
- ALBRECHT, E., ZHANG, D., SAFTNER, R.A. Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.59, p. 517–538 2012.
- ALIMI, N.A., BINK, M.C.A.M., DIELEMAN, J.A., NICOLAI, M., WUBS, M., HEUVELINK, E., MAGAN, J. Genetic and QTL analyses of yield and a set of physiological traits in pepper. **Euphytica**, v. 190, p. 181–201, 2013.
- BABA, V.Y., ROCHA, K.R., GOMES, G.P., RUAS, C.D., RUAS, P.M., RODRIGUES, R., GONÇALVES, L.S.A. Genetic diversity of *Capsicum*

chinense accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 63, p. 1371–1381, 2016.

BAHURUPE, J.V., SAKHARE, S.B., KULWAL, P.L., AKHARE, A.A., PAWAR, B.D. Genetic diversity analysis in chilli (*Capsicum annuum* L.) using RAPD markers. **Journal of life science**, v. 8, p. 915-918, 2013.

BANDILLO, N., RAGHAVAN, C., MUYCO, P.A., SEVILLA, M.A.L., LOBINA, I.T., DILLA-ERMITA, C.J., TUNG, C., MCCOUCH, S., THOMSON, M., MAULEON, R., SINGH, R.K., GREGORIO, G. REDOÑA, E., HEI LEUNG, H. Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. **Rice**, v. 6, p. 1-11, 2013.

BARAL, J.B., BOSLAND, P.W. Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, p. 826-832, 2004.

BOSLAND, P.W., COON, D. ‘NuMex Trick-or-Treat’, a No-heat Habanero Pepper. **HortScience**, v. 50, p. 1739–1740. 2015.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphisn. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

BUSO, G.S.C., BRONDANI, R.V., AMARAL, Z.P.S., REIS, A.M.M., FERREIRA, M.E. **Desenvolvimento de primers SSR para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida**. Brasília, DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa, 15. 2000. 27p.

BUSO, G.S.C., REIS, A.M.M., AMARAL, Z.P.S., FERREIRA, M.E. Novel and highly informative *Capsicum* SSR markers and their cross-species transferability. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1-13, 2016.

CARDOSO, R., RUAS, C.F., GIACOMIN, R.M., RUAS, P.M., RUAS, E.A., BARBIERI, R.L., RODRIGUES, R., GONÇALVES, L.S.A. Genetic variability in

Brazilian *Capsicum baccatum* germplasm collection assessed by morphological fruit traits and AFLP markers. **PLoSOne**, v. 13, p. e0196468, 2018.

CARVALHO, S.I.C., RAGASSI, C.F., BIANCHETTI, L.B., REIFSCHNEIDER, F.J.B., BUSO, G.S.C., FALEIRO, F.G. Morphological and genetic relationships between wild and domesticated forms of peppers (*Capsicum frutescens* L. and *C. chinense* Jacquin). **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 7447-7464, 2014.

CARVALHO, S.I.C., RAGASSI, C.F., OLIVEIRA, L.B., AMARAL, Z.P.S., FALEIRO, F.G., REIFSCHNEIDER, F.J.B., BUSO, G.S.C. Transferability of microsatellite markers of *Capsicum annuum* L. to *C. frutescens* L. and *C. chinense* Jacq. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 7937-7946, 2015.

CARVALHO, S.I.C., BIANCHETTI, L.B., RAGASSI, C.F., RIBEIRO, C.S.C., REIFSCHNEIDER, F.J.B., BUSO, G.S.C., FALEIRO, F.G. Genetic variability of a Brazilian *Capsicum frutescens* germplasm collection using morphological characteristics and SSR markers. **Genetics and molecular research**, v. 16, p.1-9, 2017.

CASTRO-CONCHA, L.A., TUYUB-CHE, J., MOO-MUKUL, A., VAZQUEZ-FLOTA, F.A., MIRANDA-HAM, M.L. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero pepper) at different stages of ripening. **The Scientific World Journal**, v. 195, p. 1-5, 2014.

CROSBY, K.M.; FERY, R.L.; LESKOVAR, D.I.; BUTCHER, J. 'CaroTex-312', a high yielding, orange-fruited, Habanero-type, F1 hybrid pepper. **HortScience**, v. 48, p. 1059-1061, 2013.

CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, p. 547-552, 2016.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

GARCÍA, C.C., BARFUSS, M.H.J., SEHR, E.M., BARBOZA, G.E., SAMUEL, R., MOSCONE, E.A., EHRENDORFER, F. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). **Annals of Botany**, v. 118, p. 35–51, 2016.

GELETA, L.F., LABUSCHAGNE, M.T., VILJOEN, C.D. Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 2361-2375, 2005.

GIUFFRIDA, D., DUGO, P., TORRE, G., BIGNARDI, C., CAVAZZA, A., CORRADINI, C., DUGO, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v. 140, p. 794–802, 2013.

GÓMEZ-GARCÍA, M.R., OCHOA-ALEJO, N. Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 19025-19053, 2013.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.

HUANG, B.E., VERBYLA, K.L., ARUNAS P. VERBYLA, A.P., RAGHAVAN, C., SINGH, V.K., GAUR, O., LEUNG, H., VARSHNEY, R.K., CAVANAGH, C.R. MAGIC populations in crops: current status and future prospects. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 999–1017, 2015.

IPGRI. **Descriptores para *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Roma: IPGRI. 1995. 51 p.

KIM, S., PARK, M., YEOM, S.I. et al. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. **Nature Genetics**, v. 46, p. 271-278, 2014.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUUK, L.E., PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639–655. 1998.

MOREIRA, A.F.P., RUAS, P.M., RUAS, C.F., BABA, V.Y., GIORDANI, W., ARRUDA, I.M., RODRIGUES, R., GONÇALVES, L.S.A. Genetic diversity, population structure and genetic parameters of fruit traits in *Capsicum chinense*. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 1–9, 2018.

NASCIMENTO, M.F., RÊGO, E.R., NASCIMENTO, N.F.F., LEITE, P.S.S., FINGER, F.L., BRUCKNER, C.H., RÊGO, M. M. Heritability of morpho-agronomic traits in ornamental pepper. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, p. 253-261, 2019.

NASS, L.L., SOUZA, K.R.R., RIBEIRO, C.S.C., REIFSCHNEIDER, F.J.B. Synthesis of a base population of Habanero pepper. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 530-532, 2015.

NASS, L.L., SOUZA, K.R.R., CARNEIRO, C.S., SOARES, R.S., RIBEIRO, C.S.C., REIFSCHNEIDER, F.J.B. Synthesis of a base population of Habanero chile pepper and initial assessment of derived F₃ lines (*Capsicum chinense*). In: **XVI Eucarpia Capsicum and Eggplant Meeting**, 2016, Kecskemet. p. 319-324, 2016.

PEÑA-YAM, L.P., MUÑOZ-RAMÍREZ, L.S., AVILÉS-VIÑAS, S.A., CANTO-FLICK, A., GUZMÁN-ANTONIO, A., SANTANA-BUZZY, N. Floral Biology Studies in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) to Implement in a Cross-Breeding Program. **Agriculture**, v. 9, p. 1-14, 2019.

POZZOBON, M.T., BIANCHETTI, L.B., SANTOS, S., CARVALHO, S.I.C., REIFSCHNEIDER, F.J.B., RIBEIRO, C.S.C. Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do banco de germoplasma da Embrapa, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 13, p. 96-100, 2015.

PRASANTH, V.P., CHANDRA, S., JAYASHREE, B., HOISINGTON, D. AlleloBin - A program for allele binning of microsatellite markers based on the

the algorithm of Idury and Cardon (1997). **Genome Research**, v.7. p. 1104-1109, 2006.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; NASS, L.L.; RIBEIRO, C.S.C. Establishment of a Habanero-type pepper (*Capsicum chinense*) synthetic base population. In: INTERNATIONAL PEPPER CONFERENCE, 22. Book of abstracts. Viña del Mar: Serie Actas INIA No 55, 2014. p.28.

RIBEIRO, C.S.C., LOPES, C.A., CARVALHO, S.I.C., HENZ, G.P., REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Embrapa Hortaliças. 2008. 200p.

RIBEIRO, C.S.C., SOUZA, K.R.R., CARVALHO, S.I.C., REIFSCHNEIDER, F.J.B. BRS Juruti: the first Brazilian Habanero-type hot pepper cultivar. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 527-529, 2015.

RIBEIRO, C.S.C., SOARES, R.S., GOMES, L.M., COELHO, L.G.F., REIFSCHNEIDER, F.J.B. Breeding Calabrian pepper lines for Brazilian agriculture from sui generis introduction of germplasm. **Horticultura Brasileira**, v. 35, p. 195-202, 2017.

RIBEIRO, C.S.C., REIFSCHNEIDER, F.J.B., CARVALHO, S.I.C., BIANCHETTI, L.B., BUSO, G.S.C. Embrapa's *Capsicum* Breeding Program - Looking back ... into the future. **Crop Breeding, Genetics and Genomics**, v. 2, p. 1-26, 2020.

SILVA, W.C., CARVALHO, S.I.C., DUARTE, J.B. Identification of minimum descriptors for characterization of *Capsicum* spp. germplasm. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 190-202, 2013.

STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics a biometrical approach**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Publishing, 1980. 633p.

TEODORO, A.F.P., ALVES, R.B.N., RIBEIRO, L.B., REIS, K., REIFSCHNEIDER, F.J.B., FONSECA, M.E.N., SILVA, J.P., AGOSTINI-COSTA, T.S. Vitamin C content in Habanero pepper accessions (*Capsicum chinense*). **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 59-62, 2013.

THUL, S. T., DAROKAR, M. P., SHASANY, A. K., AND KHANUJA, S. P. Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. **Molecular Biotechnology**, v. 51, p. 137-147, 2012.

VÁZQUEZ, P., CORTEZ, M.C.N. Use of organic alternatives in the production system of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) under greenhouse conditions. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, p. 1091-1094, 2018.

WALL, M.M., WADDELL, C.A., BOSLAND, P.W. Variation in β -Carotene and Total Carotenoid Content in Fruits of *Capsicum*. **HortScience**, v. 36, p. 746–749, 2001.

WANG, C., ULLOA, M., MULLENS, T.R., YU, J.Z., ROBERTS, P.A. QTL Analysis for Transgressive Resistance to Root-Knot Nematode in Interspecific Cotton (*Gossypium* spp.) Progeny Derived from Susceptible Parents. **PLoSOne**, v. 7: e34874, 2012.

WESP, C.L., MARTINELLII, J.A., CHAVESII, M.S., GRAICHEN, F.A.S., FEDERIZZI, L.C. Herança da resistência quantitativa à ferrugem da folha em linhagens recombinantes de aveia branca. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 138-147, 2008.

ZHANG, X., ZHANG, Z., GU, X., MAO, S., LI ,X., WANG, L., ZHANG, B. Genetic diversity of pepper (*Capsicum* spp.) germplasm resources in China reflects selection for cultivar types and spatial distribution. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, p. 1991–2001, 2016.

CAPÍTULO 3. REAÇÃO DE LINHAGENS AVANÇADAS DE PIMENTA HABANERO ÀS PRINCIPAIS DOENÇAS

(Parte do trabalho apresentado neste capítulo foi publicado na revista Horticultura Brasileira. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-0536201904>. A formatação deste capítulo segue as normas da revista)

RESUMO

A pimenta Habanero é importante no mercado internacional e começa a despertar maior interesse no nacional. No entanto, poucas cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas e com resistência aos principais patógenos estão disponíveis no Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar a reação de linhagens avançadas de pimenta do grupo Habanero, desenvolvidas pelo programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, aos seguintes patógenos: *Ralstonia pseudosolanacearum* (Rp), *Phytophthora capsici* (Pc), *Meloidogyne* (*M. incognita* raça 1 - Mi, *M. javanica* - Mj e *M. enterolobii* - Me), *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe) e aos vírus *Potato virus Y* (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). As linhagens avançadas CNPH 15.737, CNPH 15.740, CNPH 15.744, CNPH 15.745, CNPH 15.749 e CNPH 15.750 foram inoculadas com três isolados de Rp e um isolado de cada um dos seguintes patógenos: Pc, Mi, Mj, Me, Xe, PVY, PepYMV e PMMoV. A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi obtida utilizando-se valores de incidência para Pc, Rp, Xe, PVY, PepYMV e PMMoV. Foi avaliado o índice de severidade para Rp e Xe. A ocorrência de sintomas dos vírus PVY, PepYMV e PMMoV foi analisada e a confirmação de infecção foi realizada através do teste Dot-Elisa. Para as três espécies de *Meloidogyne* foram avaliados os parâmetros nematológicos índice de massa de ovo (IMO), índice de galhas (IG), número total de ovos e juvenis (NTOJ), fator de reprodução (FR) e índice de reprodução (IR). CNPH 15.737 e CNPH 15.740 mostraram-se altamente resistente aos isolados de Rp, a PVY e a Mj. As linhagens também apresentaram nível moderado de resistência a Pc e a Mi pelo índice de reprodução. CNPH 15.749 apresentou alta resistência a PVY, Mj e resistência moderada ao isolado de Pc e a Me. Pelo índice de reprodução, a linhagem

CNPH 15.749 mostrou-se muito resistente a Mi. CNPH 15.744 apresentou resistência a Mi. CNPH 15.750 foi considerada moderadamente resistente a Xe. Merece destaque especial a linhagem CNPH 15.740, com nível elevado de resistência aos isolados de Rp, PVY e Mj, e intermediário a Pc e Mi. CNPH 15.740 também possui características agronômicas desejáveis tendo, portanto, alto potencial como nova cultivar a ser disponibilizada aos produtores.

Palavras-chave: *Capsicum*, patógenos, incidência, índice de severidade, resistência.

REACTION OF ADVANCED LINES OF HABANERO PEPPER TO MAJOR DISEASES

ABSTRACT

Habanero pepper is important in the international market and interest is increasing in the national market, but few cultivars adapted and resistant to the main pathogens are available in Brazil. The objective of this study was to evaluate the reaction of Habanero advanced pepper lines to *Ralstonia pseudosolanacearum* (Rp), *Phytophthora capsici* (Pc), *Meloidogyne* (*M. incognita* race 1 (Mi), *M. javanica* (Mj) e *M. enterolobii* (Me), *Xanthomonas euvisicatoria* (Xe) e os vírus *Potato virus Y* (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). The Habanero pepper lines were developed by Embrapa Hortaliças breeding program in order to support the process of protection, registration and release of new cultivars. CNPH 15.737, CNPH 15.740, CNPH 15.744, CNPH 15.745, CNPH 15.749 and CNPH 15.750 were inoculated with three RP and one Pc, Rp, Xe, PVY, PepYMV and PMMoV isolates. Plants with wilted leaves (RP) and stem necrosis, leaf wilting and PC damping off were quantified. The area under the disease progress curve were obtained using incidence values and for Pc, Rp, Xe, PVY, PepYMV e PMMoV. The severity index for Rp and Xe was evaluated. The occurrence of symptoms of PVY, PepYMV and PMMoV was analyzed and the confirmation of infection was performed by the Dot-Elisa test. *Meloidogyne* species, egg mass index (EMI), gall index (IG), total number of eggs and juveniles (TNEJ),

reproduction factor (RF) and reproduction index (RI) were evaluated. CNPH 15.740 and CNPH 15.737 presented high resistance to RP, PVY, *M. javanica* and moderate level of resistance to *M. incognita* race 1 by RI. CNPH 15.749 presented high resistance to PVY, *M. javanica* and moderate resistance to *P. capsici* isolate and *M. enterolobii*. CNPH 15.749 also presented resistance by RI. CNPH 15.744 showed resistance to *M. incognita* race 1 by RF. CNPH 15.750 was moderately resistant to *X. euvisicatoria*. CNPH 15.740 showed good resistance levels for both diseases and presents agronomic traits of interest to the sector, therefore with a high potential to be released as a new cultivar.

Keywords: *Capsicum*, pathogens, incidence, severity index, resistance.

1. Introdução

O tipo morfológico Habanero é composto por um grupo de pimentas altamente diversificado dentro da espécie *Capsicum chinense* Jacq. Seus frutos podem apresentar diferentes níveis de pungência, tamanhos e cores (Castro-Concha *et al.* 2014). Esse tipo de pimenta é cultivado principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Teodoro *et al.* 2013), com destaque para a região de Yucatán, no México (Bosland & Coon 2015), onde a produtividade pode alcançar 40 t.ha⁻¹ (Vázquez & Cortez, 2018).

Apesar de ter se originado na bacia Amazônica, a pimenta Habanero ainda é pouco conhecida no Brasil (Ribeiro *et al.* 2015). No entanto, essa pimenta começou a despertar o interesse dos mercados nacionais e internacionais de molhos e pastas, particularmente devido ao seu sabor e aroma únicos, além de níveis de pungência geralmente altos (Nass *et al.* 2015). São poucas as cultivares de pimenta Habanero registradas e adaptadas para cultivo no Brasil. Portanto, é fundamental o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às condições brasileiras, com características de interesse para o mercado consumidor, como, por exemplo, pungência, sabor marcante, forte aroma e elevada produtividade, além de resistência aos principais patógenos que afetam as pimenteiras.

Dentre os patógenos que acometem as pimentas do gênero *Capsicum*, destacam-se aqueles que estão associados ao solo e causam danos diretos ao sistema radicular e ao colo da planta, afetando consequentemente o desenvolvimento vegetativo e a produção de frutos (Naresh *et al.* 2019). Os principais patógenos de solo reportados para pimentas são: *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov (RP; Safni *et al.*, 2014; Rossato *et al.* 2018), *Phytophthora capsici* Leonian (PC; Gilardi *et al.* 2013; Reeves *et al.* 2013; Sánchez-Chávez *et al.* 2017), e os nematoides do gênero *Meloidogyne* Goeldi (Pinheiro *et al.* 2014). Esses patógenos causam, respectivamente, as doenças murcha-bacteriana, murcha-de -fitóftora e galhas das raízes.

Além dos patógenos de solo, outros fitoparasitas associados à parte área podem causar danos diretos à cultura da pimenta. Várias espécies de vírus e bactérias são relatadas hospedando plantas de *Capsicum*, dentre estas, os vírus *Tomato spotted wilt virus* Brittlebank (TSWV); *Potato virus Y* Smith (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* Inoue-Nagata (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* McKinney (PMMoV) (Janzac *et al.* 2009; Scholthof *et al.* 2011; Özkaynak *et al.*, 2014) e as bactérias do gênero *Xanthomonas* Wakker (*X. euvesicatoria* e *X. gardneri*) (Jones *et al.*, 2006, Areas *et al.*, 2015, Roach *et al.*, 2017).

A bactéria *R. pseudosolanacearum* é originária da recente reorganização taxonômica de *R. solanacearum* Smith, anteriormente identificada como raça 1, biovar 3, filotipo I (Safni *et al.*, 2014). Esta espécie é mais agressiva que *R. solanacearum* (raças 1, 2, 3, biovars 1, 2, filotipo II) em *Capsicum*, e apresenta maiores taxas de evolução e maior distribuição geográfica no mundo (Rossato *et al.* 2018). A bactéria penetra o sistema radicular e se prolifera no xilema, causando murcha irreversível e, consequentemente, morte da planta (Lebeau *et al.* 2011).

O oomiceto *Phytophthora capsici* é encontrado em praticamente todas as regiões produtoras de solanáceas do mundo e é considerado um dos patógenos de solo mais destrutivos em pimentas do gênero *Capsicum* (Sánchez-Chávez *et al.* 2017). Este fitopatógeno causa podridão radicular e podridão da base do caule, acarretando murcha repentina, necrose de

coloração marrom-escura na base do caule e morte da planta (Dunn *et al.* 2014). A variabilidade da espécie é representada por mais de 45 raças fisiológicas (Barchenger, 2018). No Brasil, Ribeiro & Bosland (2012) identificaram oito raças fisiológicas de *P. capsici* em áreas de cultivo de pimentão, sendo a raça 18 mais frequente na região Centro-Oeste. *Phytophthora capsici* se reproduz tanto sexuada quanto assexuadamente, caracterizando-se como um problema persistente, especialmente após cultivos consecutivos de plantas suscetíveis hospedeiras (Naresh *et al.* 2019). Seu estabelecimento e sua propagação são favorecidos pela umidade excessiva, má drenagem e alta temperatura do solo (Granke *et al.* 2012; Petry *et al.* 2016).

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) também são patógenos de solo altamente nocivos às pimentas (Pinheiro *et al.*, 2014). Além da formação de galhas que bloqueiam o sistema vascular da planta (Soares *et al.*, 2018), as raízes danificadas tornam-se porta de entrada para fungos e bactérias, aumentando os danos à cultura (Mota *et al.*, 2013). São descritas mais de 95 espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi (Ghule *et al.*, 2014), no entanto *M. incognita* Kofoed & White e *M. javanica* Treub são as espécies que mais impactam a produção de *Capsicum* (Wang *et al.*, 2018). Recentemente, *M. enterolobii* (Syn. *M. mayaguensis*) (Yang & Eisenback, 1983) está ganhando importância, uma vez que fontes de resistência genética às principais espécies de *Meloidogyne* são ineficientes para o seu controle (Pinheiro *et al.*, 2014).

Potato virus Y (PVY) é uma espécie do gênero *Potyvirus*, considerado um dos patógenos virais mais destrutivos em *Capsicum* (Özkaynak *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015). Recentemente, *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), também pertencente ao gênero *Potyvirus*, tem se mostrado altamente importante em cultivo de pimentas e pimentões em todo o país (Lucinda *et al.*, 2012; Moulin *et al.*, 2014). Ambas as espécies são transmitidas por afídeos e apresentam sintomas semelhantes, como mosaico, mosqueado e escurecimento da nervura principal, podendo evoluir para deformação foliar, além de redução no desenvolvimento da planta e produtividade (Moulin *et al.*, 2014; Özkaynak *et al.*, 2014). *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) é pertencente

ao gênero *Tobamovirus*, relatado como um vírus com efeito devastador em cultivos de *Capsicum* (Antignus *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2016). Estirpes deste vírus podem ser transmitidas pelas mãos, equipamentos, contato entre plantas, irrigação, solo contaminado e sementes (Matsunaga *et al.* 2003; Kim *et al.* 2008; Özkaynak *et al.*, 2014). Os sintomas característicos de PMMoV são mosqueados e mosaico verde-amarelo nas folhas e frutos com tamanho reduzido, malformados, mosqueados e com áreas necróticas (Lima *et al.*, 2013). Este vírus possui alta estabilidade, permanecendo viável por longos períodos em restos culturais no solo, dificultando ainda mais o seu controle (Cezar *et al.*, 2009).

A bactéria do gênero *Xanthomonas* spp., causadora da mancha bacteriana, é relatada causando sérios prejuízos em áreas de cultivo de *Capsicum* em várias regiões do mundo, particularmente durante as estações de elevadas precipitação e temperatura (Potnis *et al.*, 2015; Areas *et al.*, 2018). Os principais sintomas da mancha bacteriana são lesões pequenas, marrons, angulares e embebidas em água nas folhas, caules e frutos, resultando em desfolhamento e danos diretos aos frutos (Roach *et al.*, 2018). A espécie *X. euvesicatoria* é o principal agente etiológico nas áreas de cultivo de pimentas no Brasil (Areas *et al.* 2015). A contaminação e o desenvolvimento da doença são favorecidos por longos períodos chuvosos, elevada temperatura, alta densidade de plantas e controle químico ineficiente, promovendo o aparecimento de estirpes resistentes (Dutta *et al.*, 2013).

O uso de cultivares com resistência genética é considerado a melhor estratégia de manejo e controle de doenças (Pinheiro *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Naresh *et al.* 2019). As cultivares resistentes possuem o atrativo de serem de fácil adoção pelos produtores e resultarem em menores impactos ambientais (Granke *et al.* 2012). Fontes de resistência aos patógenos supracitados foram identificadas em acessos de *Capsicum* spp. (Madeira *et al.* 2016; Petry *et al.* 2016, Rossato *et al.* 2018). O híbrido porta-enxerto para pimentão BRS Acará recentemente lançado pela Embrapa Hortaliças, apresenta resistência múltipla a diversos isolados de *P. capsici*, *R.*

pseudosolanacearum e *Xanthomonas*, além de *M. incognita*, *M. javanica* e aos vírus PVY e PepYMV (Madeira *et al.* 2016).

Pouca ênfase tem sido dada para o desenvolvimento de cultivares de *Capsicum* com resistência múltipla a doenças, tais como *C. baccatum* Wild., *C. frutescens* L. e *C. chinense*. O programa de melhoramento genético de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças tem focado principalmente no desenvolvimento de genótipos de pimenta Habanero com resistência múltipla a diversos patógenos que afetam a cultura, além de atributos como produtividade, qualidade nutricional e adaptação às condições tropicais de cultivo. Neste programa de melhoramento, foram obtidas seis novas linhagens F₅ a partir de uma população base de pimenta Habanero (*C. chinense*) de ampla variabilidade genética (Nass *et al.* 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar a reação de linhagens avançadas de pimenta do grupo Habanero desenvolvidas pelo programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças aos patógenos *Ralstonia pseudosolanacearum* (Rp), *Phytophthora capsici* (Pc), *Meloidogyne* (*M. incognita* - Mi, *M. javanica* - Mj e *M. enterolobii* - Me), *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe) e os vírus *Potato virus Y* (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV). Apesar de não ser exigida, esta informação é importante como dado adicional no processo de proteção, registro e lançamento de novas cultivares.

2. Material e métodos

2.1. Genótipos e patógenos

As linhagens avançadas de pimenta Habanero CNPH 15.737, CNPH 15.740, CNPH 15.744, CNPH 15.745, CNPH 15.749 e CNPH 15.750 (Tabela 1), do programa de melhoramento genético de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças, foram avaliadas quanto à reação a inoculação com Rp, Pc, Mi, Mj, Me, Xe, PVY, PepYMV e PMMoV. Cinco experimentos foram realizados em casa de vegetação, na Embrapa Hortaliças, localizada em Brasília, Distrito Federal, Brasil, (15°55'59.8" W e 48°08'34.2" S, com altitude de 990 m), entre novembro de 2018 a setembro de 2019.

Tabela 1. Principais características de plantas e frutos de seis linhagens de pimenta Habanero. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Linhagens	Arquitetura da planta	Formato do fruto	Cor de fruto	Pungência	Aroma
CNPH 15.737	Intermediária	Campanulado	Vermelho	Alta	Médio
CNPH 15.740	Intermediária	Campanulado	Vermelho	Alta	Médio
CNPH 15.744	Ereta	Retangular	Amarelo	Baixa	Forte
CNPH 15.745	Intermediária	Campanulado	Vermelho	Média	Fraco
CNPH 15.749	Intermediária	Campanulado	Vermelho	Muito alta	Médio
CNPH 15.750	Intermediária	Campanulado	Vermelho	Muito alta	Médio

2.2. *Ralstonia pseudosolanacearum*

As reações das seis linhagens de Habanero a *R. pseudosolanacearum* foram comparadas com dois genótipos utilizados como controles, CNPH 143 (resistente) e Tico (suscetível), ambos da espécie *C. annuum*. Linhagens e testemunhas foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato comercial Carolina Soil® estéril e mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação e transplântio.

O experimento foi realizado em delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial 8 x 3 [6 linhagens avançadas de pimenta Habanero e duas testemunhas (CNPH 143 e pimentão Tico)] e três isolados de *R. pseudosolanacearum*, com quatro repetições. As parcelas foram compostas por seis plantas, com duas plantas por vaso.

Os isolados de *R. pseudosolanacearum* usados na inoculação foram CNPH RS476, CNPH RS634 e CNPH RS639, previamente selecionados da coleção de bactérias fitopatogênicas da Embrapa Hortaliças pela alta virulência em pimenteiras, bem como pela diversidade geográfica entre os isolados. Estes isolados foram coletados em diferentes regiões do Brasil, tendo como origem Dom Pedro-MA, Guadalupe-PI e Altamira-PA, respectivamente. Para o preparo dos inóculos, utilizou-se a metodologia descrita por Rossato *et al.* (2018).

Aos 45 dias após a semeadura (DAS), as mudas das linhagens e dos genótipos controles foram inoculadas com os três isolados de *R. pseudosolanacearum*, separadamente, pulverizando-se 5 mL por planta de uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹.

diretamente sobre as raízes (Lopes & Boiteux, 2004). Após a inoculação, as plantas foram transferidas para vasos de plástico de 1 L contendo solo esterilizado e mantidas em casa de vegetação por 27 dias com aquecimento noturno, para evitar queda de temperatura abaixo de 20°C, o que poderia aumentar a chance de escape. Durante o período experimental, a temperatura foi de 30±10°C.

A incidência da doença foi avaliada a cada três dias, sendo a avaliação iniciada quando surgiram os primeiros sintomas no controle suscetível (seis dias após a inoculação). Foram contabilizadas as plantas murchas ou mortas, totalizando-se oito avaliações durante o ciclo da cultura (6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 27 dias após a inoculação - DAI), sempre realizadas no período da tarde para uniformizar a análise. A última avaliação (aos 27 DAI) ocorreu quando o número de plantas murchas se estabilizou.

Os valores de incidência média de doença de cada parcela foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Shaner & Finney, 1977). Avaliou-se também a severidade da doença aos 26 DAI utilizando-se uma escala de notas de 1 a 5 (Winstead & Kelman, 1952), em que a menor corresponde à ausência de murcha e a maior à morte da planta. Pontuações equivalentes ou acima de três foram atribuídas a plantas com sintomas irreversíveis de murcha (suscetíveis) e pontuações entre 1,5 e 2,5 foram dadas a plantas com sintoma leve de murcha, reversíveis após irrigação ou nas horas mais frescas do dia.

2.3. *Phytophthora capsici*

As reações das seis linhagens avançadas de Habanero inoculadas com o isolado Pcp116 (raça 18) de *P. capsici* foram comparadas com as reações dos controles CNPH 148 (resistente) e do pimentão Ikeda (suscetível), ambos da espécie *C. annuum*.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos (linhagens e controles) e cinco repetições, três plantas constituindo cada parcela experimental, totalizando 15 plantas por tratamento.

As mudas das linhagens e dos genótipos controles foram produzidas conforme descrito para o experimento com *R. pseudosolanacearum*. Aos 45 DAS, as mudas foram transferidas para vasos plásticos de 3 L contendo solo esterilizado. Na base de cada planta foram aplicados 3 mL de solução contendo uma suspensão de 2×10^4 zoósporos mL⁻¹ do isolado Pcp 116, dois dias após o transplante. O isolado foi coletado no estado de Goiás no ano de 2007 (Ribeiro & Bosland, 2012) e foi selecionado com base na sua alta virulência. O preparo do inóculo baseou-se na metodologia descrita por Petry *et al.* (2016).

A avaliação de incidência da doença foi iniciada aos cinco DAI, quando se verificaram as primeiras plantas murchas do controle suscetível (cultivar Ikeda), tendo sido repetida a cada três dias, totalizando-se seis avaliações. A incidência foi avaliada a partir da quantificação do número de plantas com sintomas de murcha, tombamento e necrose da base do caule em cada parcela experimental. Os valores de incidência média de cada parcela foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Shaner & Finney, 1977).

2.4. *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. incognita* raça 1 e *M. enterolobii*)

O experimento foi disposto em esquema fatorial 8 x 3, sendo seis linhagens avançadas de pimenta Habanero; o híbrido porta-enxerto BRS Acará considerado padrão de resistência a MI e MJ (Pinheiro *et al.*, 2015) e a cultivar de tomate 'Rutgers', padrão de suscetibilidade; e três espécies de nematoides de galha (*M. javanica*, *M. incognita* raça 1 e *M. enterolobii*).

As populações das espécies de *Meloidogyne* foram obtidas de raízes de tomateiro cv. Rutgers, pertencentes à coleção de nematoides do Laboratório de Nematologia da Embrapa Hortaliças. A identificação das espécies foi realizada mediante corte da região perineal de fêmeas adultas, com base nos padrões descritos por Yang & Eisenback (1983). Para análise do fenótipo da isoenzima esterase utilizou-se técnica proposta por Carneiro & Almeida (2001). O preparo dos inóculos foi realizado conforme a metodologia de extração de Hussey & Barker (1973).

As mudas das linhagens e dos genótipos controles foram produzidas conforme descrito no item 2.1. O transplante das mudas ocorreu aos 45 dias após as sementeiras para vasos plásticos com capacidade de 1,0 L contendo substrato de solo de cerrado, areia lavada, esterco bovino e palha de arroz carbonizada, na proporção de 1:1:1:1, respectivamente, previamente autoclavada (120°C, 1 atm, 1 hora).

A inoculação das três espécies de *Meloidogyne* ocorreu três dias após o transplante das mudas. Com auxílio de pipeta automática, realizou-se a inoculação de 5 mL da suspensão contendo 5.000 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J₂), em cada vaso, sobre as raízes das mudas para cada espécie do nematoide, separadamente, caracterizando a população inicial (P_i). As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação até o período de avaliação.

Decorridos 75 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas realizando-se a separação entre parte aérea e raízes. As raízes foram retiradas dos vasos e, em seguida, procedeu-se a limpeza das mesmas em água para a retirada do excesso da mistura de cultivo. Logo após, as raízes foram pesadas em balança analítica digital e as massas de ovos foram coloridas conforme metodologia de Dickson & Struble (1965). Em seguida, procedeu-se a contagem do número de massa de ovos dos nematoides presentes no sistema radicular das plantas, separadamente, em microscópio estereoscópico.

O índice de massa de ovos (IMO) foi obtido conforme Huang *et al.* (1986), utilizando-se escala de notas de 1 a 5 (1= raízes sem massa de ovos; 2= raízes com 1 a 5 massas de ovos; 3= raízes com 6 a 15 massas de ovos; 4= raízes com 16 a 30 massas de ovos e; 5= raízes com mais de 30 massas de ovos).

Para avaliação do índice de galhas (IG), o número de galhas presentes nos sistemas radiculares das plantas foi quantificado separadamente. O IG foi determinado pela escala de 1 a 5 (1= raiz sem galhas; 2= raiz com até 10 galhas pequenas; 3= raiz com até 50 galhas pequenas; 4= raiz com mais de 50 galhas pequenas e até 10 galhas grandes; e 5= raiz com mais de 50 galhas pequenas e mais de 10 galhas grandes), de acordo com Charchar *et al.*

(2003). As variáveis sintomatológicas IMO e IG foram avaliadas para auxiliarem na interpretação dos resultados em relação ao NTOJ, FR e IR.

Ao final da avaliação de IMO e IG, as raízes foram processadas para a extração de ovos e outros estádios de desenvolvimento de nematoide, de acordo com a técnica de Hussey & Barker (1973).

Após extração, foi quantificado o número total de ovos e juvenis de segundo estágio (NTOJ) com auxílio de câmara de Peters ao microscópio fotônico. A partir deste procedimento, obteve-se a população final (P_f) dos nematoides nas raízes de pimenta e tomateiro.

As variáveis número total de ovos e J₂ (NTOJ), fator de reprodução (FR) e índice de reprodução (IR) foram utilizadas para verificar a resistência dos genótipos a *M. incognita* raça 1, *M. javanica* e *M. enterolobii*.

Baseando-se na relação entre a população final (P_f) e a população inicial (P_i), estimou-se o fator de reprodução (FR), para que os genótipos fossem classificados de acordo com Oostenbrink (1966), sendo plantas com $FR < 1$ consideradas resistentes ao nematoide, e com $FR \geq 1$ consideradas suscetíveis, conforme a fórmula:

$$FR = \frac{P_f}{P_i}$$

O valor do índice de reprodução (IR) foi calculado considerando o tomateiro cv. 'Rutgers' como padrão de suscetibilidade (100%) em relação à reprodução dos nematoides obtidos nos genótipos de *Capsicum*. Assim, utilizou-se a fórmula:

$$IR(\%) = \frac{PF(n)}{PF \text{ testemunha}} \times 100$$

Em que:

- PF (n) = população final do genótipo avaliado, e
- PF testemunha = população final da testemunha suscetível.

De acordo com o critério estabelecido por Taylor (1967), o grau de resistência foi classificado como suscetível (S) quando - IR foi maior do que 50% do valor obtido para o tomateiro 'Santa Cruz Kada'; ligeiramente resistente (LR) - IR com 26-50%; moderadamente resistente (MoR) - IR com 11-25%;

muito resistente (MR) - IR com 1 a 10%; altamente resistente (AR) - IR com menos de 1%, e imune (I) - IR igual a 0.

2.5. *Xanthomonas euvesicatoria*

As linhagens de pimenta Habanero foram avaliadas quanto à reação ao isolado EH 112-P de *X. euvesicatoria*, pertencente a coleção de *Xanthomonas* do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças. Utilizou-se como padrão de resistência o genótipo CNPH 189 e como padrão de suscetibilidade a cultivar comercial Magali R (Sakata Seed Sudamerica).

As mudas das linhagens e dos genótipos controles foram produzidas conforme descrito no item 2.1. Aos 45 dias após a semeadura, as mudas foram transferidas para vasos plásticos com volume de 1 L, contendo solo esterilizado e mantidas em casa de vegetação.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com oito tratamentos e quatro repetições, sendo cada parcela constituída por seis plantas, totalizando 192 plantas.

Para a multiplicação e preparo do inóculo, utilizou-se a metodologia descrita por Pontes *et al.* (2012). A inoculação da bactéria foi feita no 14º dia após o transplante pulverizando, com o uso de um pulverizador manual, cerca de 5 mL de uma suspensão bacteriana ajustada em espectrofotômetro para $O.D._{600} = 0,3$, o que corresponde a aproximadamente 5×10^8 ufc/mL, e diluída para 5×10^7 ufc/mL.

As plantas foram submetidas à condição de câmara úmida durante 48 horas antes e após a inoculação, utilizando-se nebulizadores em regime de 30 segundos de nebulização a cada 30 minutos, resultando em uma umidade relativa média no período de 70%. Durante o período compreendido entre a inoculação e a última avaliação, as médias de temperatura máxima e mínima foram de 31,2 e 18,6°C, respectivamente.

As plantas foram acompanhadas diariamente para observação do aparecimento dos sintomas. A incidência da doença foi avaliada a cada dois dias a partir do sexto dia após a inoculação, determinando-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A severidade do patógeno foi

verificada quantitativamente utilizando-se como padrão uma escala modificada de Horsfall-Barratt (Scott *et al.*, 1995), com notas de 1 a 5, onde: 1 = nenhum sintoma aparente; 2 = lesões pequenas em uma a três folhas; 3 = lesões grandes em até metade da quantidade de folhas das plantas; 4 = as lesões grandes começam a coalescer e mais da metade da quantidade de folhas das plantas estão atacadas; 5 = mais da metade da quantidade de folhas das plantas já foram atacadas; as necroses já ocupam a maior parte de suas superfícies; ocorrência de abscisão foliar e a planta está com o crescimento estagnado ou morta.

2.6. *Potato virus Y* (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)

As linhagens avançadas de pimenta Habanero foram avaliadas quanto a reação aos vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* (PVY e PepYMV) e *Tobamovirus* (PMMoV). O híbrido porta-enxerto BRS Acará foi utilizado como padrão de resistência a PVY e PepYMV e a cultivar de pimentão Ikeda como padrão de suscetibilidade às três espécies de vírus. Para cada espécie de vírus foi realizado um experimento.

Os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados para cada espécie de vírus, com oito tratamentos (linhagens e controles resistente e suscetível) e oito repetições. A parcela experimental foi constituída por uma planta, totalizando oito plantas avaliadas por genótipo, para cada espécie de vírus.

As mudas das linhagens e dos genótipos controles foram produzidas conforme descrito no item 2.1. Aos 45 dias após a semeadura, as mudas foram transferidas para vasos plásticos com volume de 1 L, contendo solo esterilizado e mantidas em casa de vegetação.

Para a produção de inóculo de PVY, PepYMV e PMMOV, a multiplicação foi realizada, separadamente, em plantas de tomateiro cv. Santa Cruz e pimentão 'Ikeda', suscetíveis aos patógenos. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação.

A confirmação da identidade dos isolados foi realizada no laboratório de virologia da Embrapa Hortaliças, através do teste sorológico Dot-Elisa (Clark & Adams, 1977), utilizando antissoros policlonais contra cada espécie.

A preparação dos inóculos foi realizada pela maceração de 1 g de folhas jovens das plantas multiplicadoras infectadas com PVY, PepYMV e PMMoV em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,2, com sulfito de sódio a 0,01%, e com uso de Carborundum (600 mesh). Os inóculos foram transmitidos, separadamente, por fricção manual nos dois primeiros pares de folhas verdadeiras, em plantas com 47 dias de idade. Para que não houvesse escapes, a inoculação de cada vírus foi repetida três dias após a primeira inoculação.

A avaliação de incidência da doença foi iniciada aos seis DAI, quando se verificaram as primeiras plantas sintomáticas no controle suscetível (cultivar Ikeda), tendo sido repetida a cada dois dias, totalizando-se oito avaliações durante o período experimental. As incidências de PVY e PepYMV foram avaliadas a partir da quantificação do número de plantas com sintomas de mosaico, mosqueado, clareamento de nervuras e faixas de coloração verde-escuro associadas às nervuras principais das folhas, e com sintomas de mosaico nas folhas para PMMoV, em cada parcela experimental. Avaliou-se também a ocorrência de plantas sintomáticas e a infecção das espécies virais foi confirmada pelo teste Dot-Elisa (Clark & Adams, 1977).

2.7. Análise estatística

A homogeneidade e normalidade dos erros do modelo matemático foram testadas, via testes de Bartlett (1937) e Jarque & Bera (1987), respectivamente. As médias para as variáveis nematológicas estão apresentadas nas tabelas com os valores originais, porém os valores obtidos foram transformados para $\log(x+5)$. Foram realizadas as análises de variância da severidade para Rp e Xe e da AACPD para Rp, Pc e Xe. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com auxílio dos *softwares* estatísticos SISVAR v.5.6 (Ferreira, 2011) e AgroEstat

(Barbosa & Maldonado, 2015). Também foi realizada a análise de correlação de Pearson entre os resultados de AACPD e severidade para Rp.

3. Resultados e discussão

3.1. Reação a *Ralstonia pseudosolanacearum*

Efeito significativo entre as linhagens de pimenta Habanero e entre os isolados de *R. pseudosolanacearum* foi detectado tanto para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) quanto para severidade. Foi verificada diferença significativa para a interação entre genótipos e isolados para ambas as avaliações. Observou-se também correlação significativa entre os parâmetros AACPD e severidade, com valores de r para os isolados CNPH RS476, CNPH RS634 e CNPH RS639 de 0,80; 0,87 e 0,88, respectivamente. Desta forma, é possível afirmar que AACPD e severidade são parâmetros altamente associados.

A inoculação foi bem-sucedida para todos os isolados e as condições ambientais foram favoráveis para o desenvolvimento da doença, permitindo a diferenciação da incidência e das classes de resistência entre os genótipos. A evolução da doença ocorreu de forma rápida na testemunha suscetível, como esperado, apresentando os primeiros sintomas de murcha (Figura 5-A) aos cinco DAI. O controle padrão de resistência, CNPH 143, mostrou-se assintomático a todos os isolados, como observado anteriormente por Lopes & Boiteux (2004).

CNPH 15.737 e CNPH 15.740 apresentaram as menores incidências, AACPD e severidade, em valores médios, para os três isolados de *R. pseudosolanacearum*, diferindo significativamente do padrão de suscetibilidade (Figura 1 e Tabela 2). CNPH 15.740 não apresentou plantas murchas durante o período de realização do experimento quando inoculada com o isolado CNPH RS476. As linhagens CNPH 15.737, CNPH 15.740 e CNPH 15.744 foram altamente resistentes ao isolado CNPH RS476, não diferindo significativamente do genótipo padrão de resistência CNPH 143 para todas as avaliações (Figura 1 e Tabela 2).

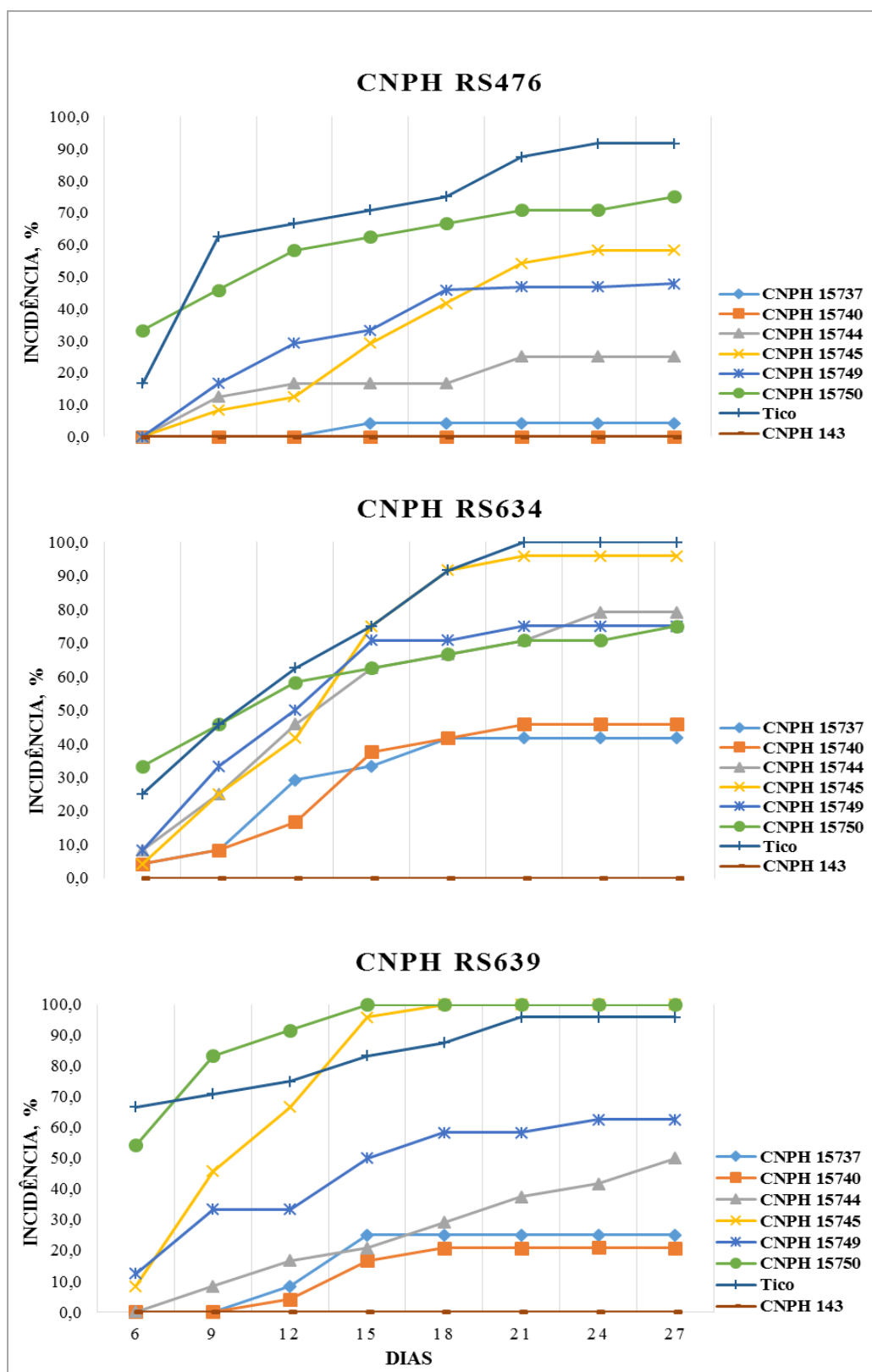


Figura 1. Incidência de plantas murchas em seis linhagens avançadas de pimenta Habanero e testemunhas de suscetibilidade (Tico) e resistência (CNPH 143) ao longo do tempo, em função da inoculação com três isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (CNPH RS476, CNPH RS634 e CNPH RS639). Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Tabela 2. Área total abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e valores médios de severidade em seis linhagens avançadas de pimenta Habanero e nas testemunhas de suscetibilidade (Tico) e resistência (CNPH 143) inoculadas com três isolados de *Ralstonia pseudosolanacearum* (CNPH RS476, CNPH RS634 e CNPH RS639). Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	CNPH RS476				CNPH RS634				CNPH RS639			
	AACPD		Severidade		AACPD		Severidade		AACPD		Severidade	
CNPH 15.737	0,6	Cb ¹	1,1	BCa	5,9	Ca	1,6	DEa	3,3	Cab	1,4	DEa
CNPH 15.740	0	Cb	1,0	Cb	6,0	Ca	1,8	CDa	2,4	Cab	1,2	Eb
CNPH 15.744	3,3	BCb	1,2	BCb	10,5	BCa	2,4	BCa	4,8	BCb	1,3	Eb
CNPH 15.745	6,3	Bb	1,5	BCb	12,9	ABa	2,7	Ba	15,1	Aa	2,9	Ba
CNPH 15.749	6,3	Bb	1,8	ABb	11,1	Ba	2,7	Ba	8,8	Bab	2,0	CDb
CNPH 15.750	11,2	Ab	2,3	Ab	16,9	Aa	4,3	Aa	17,0	Aa	4,1	Aa
Tico	13,3	Aa	1,8	ABb	14,3	ABa	4,3	Aa	15,3	Aa	4,5	Aa
CNPH 143	0	Ca	1,0	Ca	0	Da	1,0	Ea	0	Ca	1,0	Ea
CV (%)	15,3		6,5		12,1		8,8		22,6		8,2	

¹Média seguida pela mesma letra maiúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey; Média seguida pela mesma letra minúscula na linha não diferencia significativamente os isolados de *R. pseudosolanacearum* ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Elevada resistência das linhagens CNPH 15.737, CNPH 15.740 e CNPH 15.744 também foi observada para o isolado CNPH RS639, para as variáveis AACPD e severidade (Tabela 2). CNPH 15.737 não diferiu significativamente do genótipo CNPH 143 para severidade quando inoculado com o isolado CNPH RS634. Apesar da linhagem CNPH 15.740 diferir significativamente do padrão de resistência para o isolado CNPH RS634, tanto para AACPD quanto para severidade, observou-se que esta linhagem apresentou um bom nível de resistência quando comparada à testemunha suscetível.

As linhagens avaliadas apresentaram diferentes níveis de resistência aos isolados de *R. pseudosolanacearum* testados. Menores incidências de plantas sintomáticas foram observadas para o isolado CNPH RS476 em comparação ao isolado CNPH RS634, que foi altamente virulento (Figura 1). Este fato reforça a afirmação de Lopes *et al.* (2015) de que a resistência à murcha bacteriana é específica em relação ao isolado, ao invés de ser específica em relação ao filotipo ou biovar. Essa informação deve ser levada em consideração em programas de melhoramento genético visando resistência à murcha bacteriana em diferentes espécies de plantas hospedeiras (Lopes & Boiteux, 2004; Wicker *et al.* 2007).

A Embrapa Hortaliças tem desenvolvido estudos na identificação e seleção de fontes de resistência a *R. pseudosolanacearum* em *Capsicum*

(Lopes & Boiteux, 2004; Rossato *et al.* 2018) incluindo os acessos CNPH 143 ('MC-4'), PBC 631', 'PBC 066', 'PBC 1347' e 'PBC 473 (Lopes & Boiteux, 2004) e CNPH 3800 (Rossato *et al.* 2018). As cultivares de pimenta Habanero BRS Nandaia e BRS Juruti, lançadas anteriormente pelo programa, apresentam resistência intermediária a *R. pseudosolanacearum* (Ribeiro *et al.* 2015).

Dentre as linhagens avaliadas no presente estudo, CNPH 15.740 e CNPH 15.737 se destacaram por apresentar elevado nível de resistência aos três isolados de *R. pseudosolanacearum*.

3.2. Reação a *Phytophthora capsici*

A viabilidade do isolado Pcp 116 (raça 18) e as condições experimentais foram satisfatórias, uma vez que elevados valores de incidência e AACPD para murcha, tombamento e necrose foram observados na cultivar de pimentão Ikeda, usada como testemunha suscetível (Figura 2 e Tabela 3). Ribeiro & Bosland (2012) relataram a elevada virulência da raça 18 de *P. capsici* baseada na reação de patogenicidade em genótipos de pimentas. A alta virulência deste isolado também foi constatada no presente trabalho, sendo que apenas o genótipo padrão de resistência (CNPH 148) não apresentou plantas sintomáticas (Tabela 3).

Todas as linhagens avaliadas, com exceção de CNPH 15.744, apresentaram níveis de resistência ao isolado Pcp116 superiores à testemunha suscetível (Figura 2 e Tabela 3). A linhagem CNPH 15.749 apresentou os menores valores de AACPD para murcha de plantas, não diferindo significativamente do padrão de resistência CNPH 148. Para a característica tombamento, apenas a linhagem CNPH 15.744 mostrou-se suscetível. As linhagens CNPH 15.749, CNPH 15.740, CNPH 15.745 e CNPH 15.750 apresentaram os menores valores de ocorrência de necrose da base do caule entre as linhagens avaliadas, diferindo significativamente em relação à testemunha suscetível. No entanto, as quatro linhagens apresentaram maior ocorrência de necrose na base do caule em relação ao padrão de resistência CNPH 148.

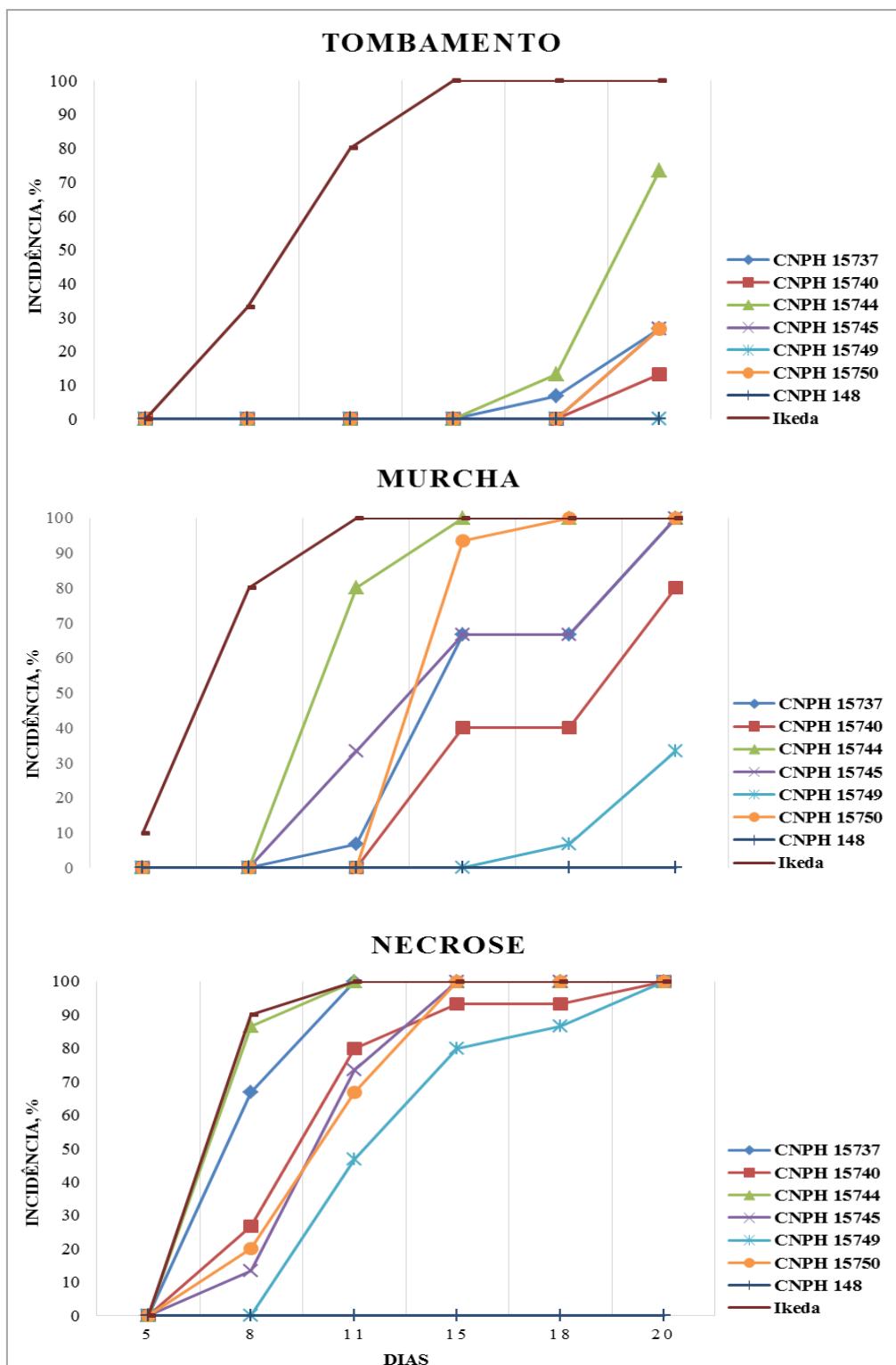


Figura 2. Incidência de plantas tombadas, murchas e com necrose na base do caule em seis linhagens avançadas de pimenta Habanero e nas testemunhas de suscetibilidade (Ikeda) e resistência (CNPH 148) ao longo do tempo, em função da inoculação do isolado de *Phytophthora capsici* Pcp 116. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Tabela 3. Área total abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para os sintomas de tombamento, murcha das folhas e necrose na base do caule em seis linhagens avançadas de pimenta Habanero e nas testemunhas de suscetibilidade (Ikeda) e resistência (CNPH 148) inoculadas com o isolado de *Phytophthora capsici* Pcp 116. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	AACPD		
	Tombamento	Murcha	Necrose
CNPH 15.737	0,97 c ¹	7,23 c	14,50 a
CNPH 15.740	0,40 c	6,30 c	12,13 b
CNPH 15.744	2,53 b	11,80 b	15,10 a
CNPH 15.745	0,80 c	8,17 bc	11,97 b
CNPH 15.749	0 c	1,17 de	11,10 b
CNPH 15.750	0,80 c	8,77 bc	11,93 b
Ikeda	13,50 a	15,30 a	15,20 a
CNPH 148	0 c	0 e	0 c
CV (%)	25,5	18,7	11,2

¹Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos de *Capsicum* (p<0,05), pelo teste de Tukey.

A infecção por *P. capsici* pode levar à expressão de múltiplos sintomas da doença, tais como podridão da raiz, murcha foliar e necrose da haste, e cada um desses sintomas apresenta um mecanismo de resistência diferente, requerendo a presença de genes de resistência específicos (*R*) a cada um (Reeves *et al.* 2013; Barchenger *et al.* 2017). Portanto, a ocorrência de necrose na base do caule nas linhagens estudadas pode estar relacionada à presença de genes diferentes dos que determinam a resistência parcial observada na maioria das linhagens estudadas considerando-se os sintomas de murcha e tombamento (Figura 2 e Tabela 3).

Steiner & Bosland (2008) relatam que o melhoramento para resistência a *P. capsici* em pimentas é difícil e complexo devido, principalmente, à natureza quantitativa da herança (Naresh *et al.* 2019). Naresh *et al.* (2019) destacam que a resistência do genótipo CM 334 (do qual foi obtido CNPH 148) a vários isolados de *P. capsici* é poligênica com efeito aditivo e epistático, por isso pouco sucesso tem sido obtido em programas de melhoramento utilizando este material. A resistência apenas parcial das linhagens de pimenta Habanero pode estar relacionada a esse efeito complexo, porém são necessários mais estudos para sua elucidação.

A linhagem CNPH 15.749 se destacou por apresentar níveis de resistência superiores às demais linhagens avaliadas e à testemunha suscetível, diferindo do padrão de resistência somente com relação à

ocorrência de necrose na base do caule. CNPH 15.740 apresentou resistência moderada ao isolado de *P. capsici*.

3.3. Reação a *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. incognita* raça 1 e *M. enterolobii*)

Plantas inoculadas com as três espécies de *Meloidogyne* apresentaram as primeiras galhas nas raízes aos 35-40 dias após a inoculação (Figura 5-C). Na parte aérea das plantas inoculadas com *M. enterolobii* foi observado amarelecimento e redução de crescimento aos 50-55 dias após a inoculação. Os mesmos sintomas foram observados nas plantas inoculadas com *M. incognita* raça 1, porém com menor severidade. Plantas inoculadas com *M. javanica* não apresentaram tais sintomas.

A viabilidade dos inóculos e as condições experimentais mostraram-se satisfatórias, pois os valores de NTOJ obtidos na testemunha de suscetibilidade, tomateiro 'Rutgers', foram altos para todas as espécies (Tabelas 4), diferindo dos demais genótipos avaliados.

Houve interação significativa, pelo teste F ($p < 0,05$), para todas as variáveis analisadas.

Como esperado, o híbrido porta-enxerto BRS Acará comportou-se como resistente a *M. javanica* e *M. incognita* raça 1, com FR e IR inferior a 1,0 e suscetíveis a *M. enterolobii* (FR > 1,0). Madeira *et al.* (2016) relatam a resistência do híbrido para as duas espécies de nematoides de galhas.

Todas as linhagens apresentaram médias de IMO, IG e NTOJ inferiores ao padrão de suscetibilidade, tomateiro 'Rutgers' para *M. javanica*. Quando se observou a reação das linhagens pelo fator de reprodução, estas foram classificadas como resistentes, obtendo valores médios inferiores a 1 (Tabela 4). CNPH 15.744 e CNPH 15.745 foram classificadas pelo IR como altamente resistentes. As demais linhagens foram consideradas muito resistentes a *M. javanica*.

Quando avaliada a reação a *M. incognita* raça 1, observou-se que a linhagem CNPH 15.744 apresentou os menores valores para IMO, IG e NTOJ, diferindo significativamente, pelo teste Tukey ($p < 0,05$), dos demais genótipos. CNPH 15.744 foi classificada como resistente e altamente resistente pelo FR e

IR, respectivamente. CNPH 15.737, CNPH 15.740, CNPH 15.745 e CNPH 15.749 foram classificadas como muito resistente pelo IR, com valores médios entre 6,28 e 8,69.

Com relação a *M. enterolobii*, todas as linhagens apresentaram valores de IMO e IG superiores a 3 e 2,8, respectivamente. CNPH 15.749 apresentou a menor média de NTOJ, diferindo significativamente das demais linhagens e do padrão de suscetibilidade. Quanto a reação pelo FR, todas as linhagens foram classificadas como suscetíveis a *M. enterolobii*. No entanto, pelo IR a linhagem CNPH 15.749 foi classificada como moderadamente resistente (IR entre 11-25%) e CNPH 15.745 como ligeiramente resistente (IR entre 26-50%). A alta suscetibilidade de *Capsicum* a *M. enterolobii* também foi relatada em diversos estudos. Gonçalves *et al.* (2014), ao avaliarem 13 acessos de pimentas, observaram IR de 36,90 a 397,70, sendo caracterizados como ligeiramente resistentes a suscetíveis. Oliveira *et al.* (2009), ao testarem diferentes espécies de *Capsicum*, observaram que todos os acessos pertencentes a *C. chinense* foram suscetíveis a *M. enterolobii*.

Quanto à resistência múltipla às espécies de nematoides de galha, a linhagem CNPH 15.744 foi considerada resistente e altamente resistentes a *M. javanica* e *M. incognita* raça 1, simultaneamente. No entanto, a linhagem não foi resistente a *M. enterolobii*.

Pinheiro *et al.* (2013) relatam que a resistência a *M. enterolobii*, aparentemente, é mediada por genes distintos aos que conferem resistência a *M. incognita* e *M. javanica*. Em pimentas, pelo menos 10 genes dominantes, *Me1* a *Me7*, *Mech1*, *Mech2* e *N*, foram relatados como conferindo resistência a *Meloidogyne* spp. (Bucki *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). *Me1*, *Me3*, *Me7* e *N* conferem resistência a uma ampla gama de nematoides de galhas, incluindo *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita* (Changkwian *et al.*, 2019). O híbrido comercial Snooker, por exemplo, possui a piramidação dos genes *Me1* e *Me3/Me7*, sendo altamente resistente a *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*, no entanto, este híbrido é suscetível a *M. enterolobii* (Pinheiro *et al.*, 2015).

Tabela 4. Reação de linhagens avançadas de pimenta Habanero aos nematoides das galhas *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Meloidogyne enterolobii*. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	<i>M. javanica</i>						
	IMO ¹	IG ²	NTMJ ³	FR ⁴	Reação ⁵	IR ⁶	Reação ⁷
CNPH 15.737	1,2 b	1,2 b	600 b	0,12	R	1,13	MR
CNPH 15.740	1,2 b	1,2 b	600 b	0,12	R	1,13	MR
CNPH 15.744	1,0 b	1,0 b	150 bc	0,03	R	0,28	AR
CNPH 15.745	1,0 b	1,0 b	200 bc	0,04	R	0,37	AR
CNPH 15.749	1,2 b	1,2 b	850 b	0,17	R	1,60	MR
CNPH 15.750	1,2 b	1,2 b	700 b	0,14	R	1,32	MR
BRS Acará	1,0 b	1,0 b	0 c	0	R	0	I
Tomateiro	3,0 a	3,0 a	53050 a	10,61	S	100,0	S
<i>M. incognita</i> raça 1							
CNPH 15.737	1,6 cd	1,6 cd	7.750 b	1,55	S	6,67	MR
CNPH 15.740	2,2 c	2,2 c	10.100 b	2,02	S	8,69	MR
CNPH 15.744	1,3 d	1,3 d	300 c	0,06	R	0,25	AR
CNPH 15.745	2,5 bc	2,5 bc	8.850 b	1,77	S	7,62	MR
CNPH 15.749	2,2 c	2,2 c	7.300 b	1,46	S	6,28	MR
CNPH 15.750	3,3 ab	3,3 ab	110.200 a	22,04	S	94,83	S
BRS Acará	1,0 d	1,0 d	0 c	0	R	0	I
Tomateiro	3,8 a	3,8 a	116.200 a	23,24	S	100,0	S
<i>M. enterolobii</i>							
CNPH 15.737	3,8 ab	3,2 bc	99.700 a	19,9	S	93,0	S
CNPH 15.740	4,1 a	3,5 ab	88.700 ab	17,7	S	82,7	S
CNPH 15.744	3,3 ab	2,8 d	56.800 bc	11,3	S	53,0	S
CNPH 15.745	3,1 b	3,0 bc	48.600 c	9,7	S	45,3	LR
CNPH 15.749	3,5 ab	3,0 bc	20.000 d	4,0	S	18,6	MoR
CNPH 15.750	3,6 ab	3,0 bc	96.750 a	19,3	S	90,2	S
BRS Acará	4,0 ab	4,0 a	50.850 c	10,2	S	47,4	LR
Tomateiro	4,0 ab	3,8 ab	107.150 a	21,4	S	100,0	S
CV (%)	8,81	9,04	27,52	-	-	-	-

¹IMO: índice de massa de ovos; ²IG: índice de galhas; ³NTMJ: número total de ovos e juvenis de segundo estágio; ⁴FR: fator de reprodução; ⁵Reações de resistência com base no FR (R: plantas resistentes; S: plantas suscetíveis); ⁶IR: índice de reprodução; ⁷reação de resistência com base no IR (I: imune; AR: altamente resistente; MR: muito resistente; MoR: moderadamente resistente; LR: ligeiramente resistente; S: suscetível). Dados transformados para log (x+1). Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Em geral, as classificações pelo índice e fator de reprodução foram efetivas para a identificação de genótipos resistentes a *M. incognita* raça 1, *M. javanica* e *M. enterolobii*; entretanto, a classificação proposta por Taylor (1967) proporcionou a distribuição mais ampla de classes (I, AR, MR, MoR, LR e S), permitindo maior flexibilidade na classificação, enquanto a metodologia de Oostenbrink (1966) classificou os genótipos exclusivamente como resistentes (R) ou suscetíveis (S). Apesar da classificação de Oostenbrink (1966) proporcionar maior rigidez na identificação de fontes de resistência aos nematoides das galhas, observa-se que os materiais que apresentaram

inibição na reprodução das espécies de nematoides foram classificados como suscetíveis, estando bem próximo do nível de classificação de resistente ($F < 1$). Por exemplo, CNPH 15.479 e CNPH 15.737 apresentaram valores de FR para *M. incognita* raça 1 de 1,46 e 1,55, respectivamente, sendo assim consideradas suscetíveis ao nematoide, porém com valores próximos de 1, diferentemente da linhagem CNPH 15.750, que apresentou FR de 22,04. Contrapondo esta classificação, no índice de reprodução as mesmas linhagens foram consideradas muito resistentes. Portanto, o índice de reprodução proporciona a classificação dos genótipos por níveis de resistência, sendo considerado mais viável na seleção de potenciais genótipos em programas de melhoramento.

3.4. Reação a *Xanthomonas euvesicatoria*

Os primeiros sintomas de mancha bacteriana foram observados em algumas plantas da cultivar Magali R, logo aos cinco dias após a inoculação (Figura 5-D). A cultivar apresentou elevados valores de severidade, AACPD e taxa de abscisão foliar (Tabela 5), possibilitando confirmar a viabilidade e patogenicidade do isolado EH 112-P.

A linhagem CNPH 15.750 apresentou a menor taxa de incidência do patógeno no decorrer do experimento (Figura 3), distanciando-se em até 20%, ao final das avaliações (20 dias), das demais linhagens e da cultivar Magali R, testemunha de suscetibilidade.

CNPH 15.750 apresentou os menores valores de AACPC, não diferindo significativamente das linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.749, e média inferior para abscisão foliar (Tabela 5). Apesar de não diferir estatisticamente das demais linhagens, exceto para CNPH 15.745, a linhagem CNPH 15.750 mostrou-se numericamente inferior para severidade da doença, com média de 2,9. Portanto, observa-se que a linhagem de pimenta Habanero CNPH 15.750 apresenta nível moderado de resistência a *X. euvesicatoria* em comparação as demais linhagens.

Na literatura, há escassez de trabalhos relacionados à avaliação e seleção de cultivares pertencentes à espécie *C. chinense* a isolados de *Xanthomonas*, sendo usualmente encontrados artigos que descrevem a

resistência de *C.annuum* ao patógeno (Costa *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2017). No Brasil, a única menção a resistência de pimenta Habanero à *Xanthomonas* foi feita por Ribeiro *et al.* (2015), classificando a cultivar BRS Juruti como moderadamente resistente a *Xanthomonas euvesicatoria* e *X. gardneri*.

O controle de resistência à mancha bacteriana em *Capsicum* tem sido reportado pela ação de seis genes dominantes (*Bs1*, *Bs2*, *Bs3*, *Bs4*, *Bs7* e *BsT*) e dois genes recessivos (*bs5* e *bs6*) (Potnis *et al.*, 2015; Potnis *et al.*, 2019;). No entanto, a resistência à *Xanthomonas* conferida pelos genes dominantes não é durável, uma vez que cada gene descrito pode ser superado por raças específicas do patógeno (Silva *et al.*, 2017). Portanto, a resistência quantitativa/horizontal deve ser enfatizada como alternativa mais viável para controle das raças de mancha bacteriana em plantas de *Capsicum* (Silva *et al.*, 2017; Potnis *et al.*, 2019).

Tendo em vista a importância da mancha bacteriana em cultivo de pimentas em todo o mundo, como relatado por Osdaghi *et al.* (2016), são necessários esforços dos programas de melhoramento na avaliação, seleção e desenvolvimento de novas cultivares resistentes ao patógeno, em especial as pimentas pertencentes ao grupo Habanero.

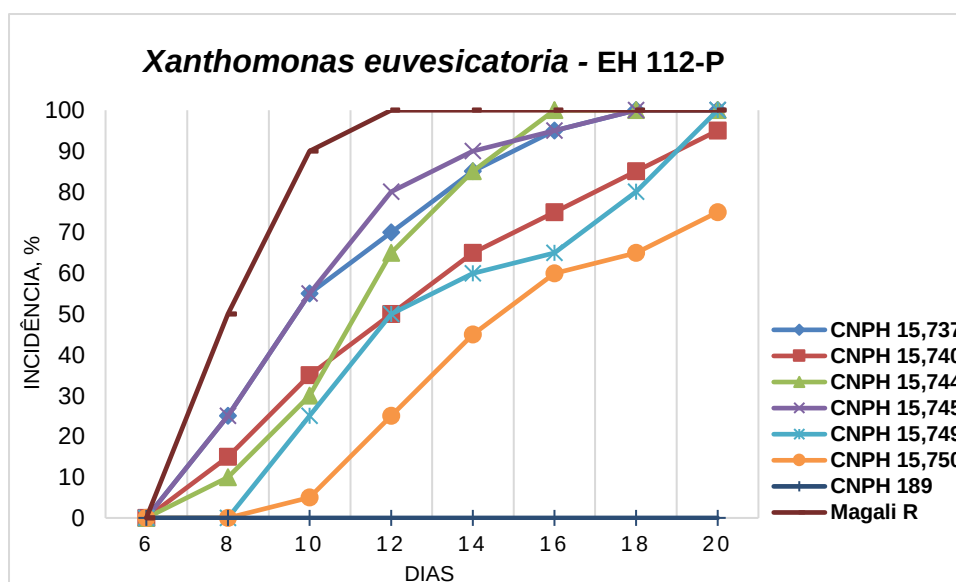


Figura 3. Incidência de plantas sintomáticas em seis linhagens avançadas de pimenta Habanero e testemunhas de resistência (CNPH 189) e suscetibilidade (Magali R), ao longo do tempo, em função da inoculação com o isolados de *Xanthomonas euvesicatoria*, EH 112-P. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Tabela 5. Área total abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), valores médios de severidade e porcentagem de abscisão foliar em seis linhagens avançadas de pimenta Habanero e nas testemunhas de resistência (CNPH 189) e suscetibilidade (Magali R) inoculadas com o isolado de *Xanthomonas euvesicatoria*, EH 112-P. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	AACPD	Severidade	Abscisão foliar
CNPH 15.737	9,6 ab ¹	4,1 ab	27.2 ab
CNPH 15.740	7,4 cd	3,8 ab	23.8 abc
CNPH 15.744	9,1 ab	4,0 ab	27.8 ab
CNPH 15.745	9,9 ab	4,5 a	37.9 a
CNPH 15.749	6,6 cd	3,5 ab	20.9 bc
CNPH 15.750	4,7 d	2,9 b	9.5 d
CNPH 189	0 e	1,0 c	0 e
Magali R	11,8 a	4,8 a	32.4 ab
CV (%)	23,2	16,2	23,9

¹Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos de *Capsicum* (p<0,05), pelo teste de Tukey.

3.5. Reação a *Potato virus Y* (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)

Sintomas iniciais de PVY e PepYMV foram observados em plantas da cultivar de pimentão Ikeda, padrão de suscetibilidade, no sexto dia após a inoculação (Figura 5 – E). As folhas da cultivar apresentaram escurecimento da nervura principal, progredindo para mosaico e mosqueado. Para PMMoV, sintomas foram observados no quarto dia após a inoculação, com mosaico e mosqueado nas folhas.

As linhagens CNPH 15.737, CNPH 15.740 e CNPH 15.749 não apresentaram sintomas de PVY durante as avaliações (Figura 4). A resistência das linhagens citadas foi confirmada ao final do período experimental, a partir da verificação de plantas assintomáticas e pelo teste sorológico Dot-Elisa (Tabela 6). CNPH 15.740, quando avaliada em condição de campo, com incidência natural do vetor e do patógeno, também apresentou ausência de sintomas e resultado negativo em todas as plantas para o teste Dot-Elisa para PVY (Tabela 5, Capítulo 3). CNPH 15.745 apresentou baixa incidência de PVY e, ao final das avaliações, apenas três plantas (38%) mostraram-se sintomáticas e positivas pelo teste sorológico.

CNPH 15.745 foi a única linhagem que apresentou plantas sem sintomas de PepYMV. A linhagem mostrou a menor incidência e ocorrência de

plantas com sintomas (62,5%). No teste sorológico, houve a confirmação de cinco plantas infectadas pelo vírus.

As linhagens foram consideradas suscetíveis a PMMoV, com alta incidência do patógeno no decorrer das avaliações, com a ocorrência de 100% de plantas sintomáticas e positivas para o teste Dot-Elisa.

As espécies virais PVY, PepYMV e PMMoV são consideradas as mais problemáticas em áreas de cultivo de pimenta (Kim *et al.*, 2008; Janzac *et al.*, 2009; Scholthof *et al.*, 2011; Özkaynak *et al.*, 2014; Moulin *et al.*, 2014). Fontes de resistência genética a PVY e PepYMV em genótipos de *Capsicum* são descritos em diversos trabalhos (Boiteux *et al.*, 1996; Moodley *et al.*, 2019). Kim *et al.* (2017), que relatam que o gene de amplo espectro, *Pvr4*, está envolvido na resistência a vários potyvírus, incluindo *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV), PVY e PepYMV. De acordo com os autores, não há relatos de isolados de campo quebrando a resistência do gene *Pvr4*. Kim *et al.* (2015) descrevem a resistência do genótipo Criollo de Morelos 334 (CM334) a PVY. CM334 também possui resistência a PepYMV (Bento *et al.*, 2013). Este genótipo possui o gene *Pvr4*, sendo amplamente utilizado em programas de melhoramento genético para transferência da resistência contra os agentes virais (Rezende *et al.*, 2019). Ribeiro *et al.* (2015) relatam a resistência da cultivar de Habanero BRS Juruti a PVY e PepYMV.

A resistência de *Capsicum* ao gênero *Tabomovirus* (PMMoV) é governada por quatro genes dominantes distintos, conhecidos como L^1 a L^4 , (Antignus *et al.*, 2008; Deri *et al.*, 2018). Resistência genética a PMMoV foi relatada em dois acessos americanos de *C. chinense*, PI 152225 e PI 159236, possuindo o gene L^3 (Antignus *et al.*, 2008). Özkaynak *et al.* (2014) relatam a piramidação dos genes *Pvr4* e L^4 em uma linhagem elite de pimentão para resistência a PVY e PMMoV. Ainda não há relatos de resistência a PMMoV em pimentas do grupo Habanero. Portanto, o desenvolvimento de cultivares de Habanero resistentes ao vírus deve ser considerado em futuros programas de melhoramento.

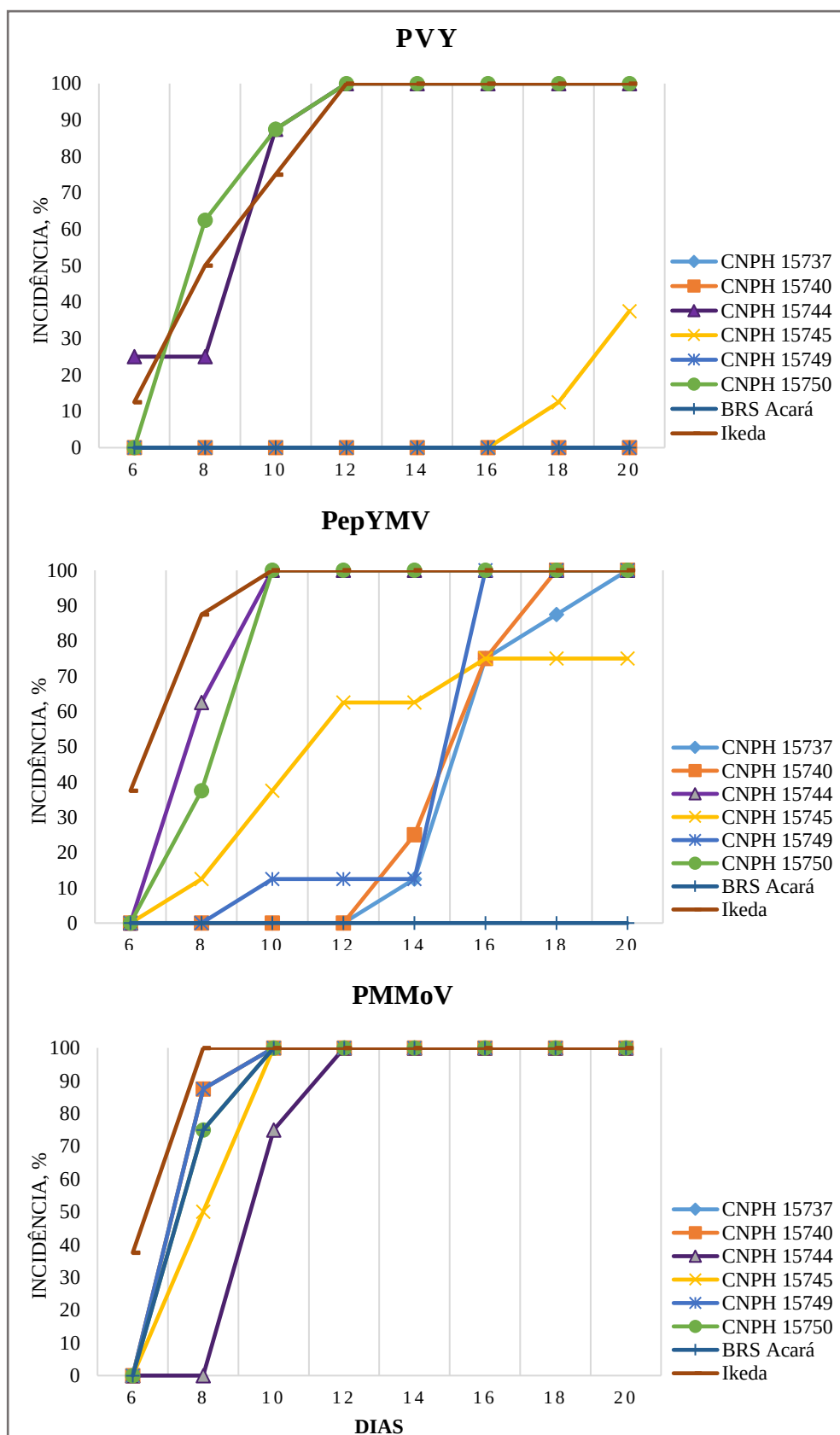


Figura 4. Incidência de plantas sintomáticas em seis linhagens avançadas de pimenta Habanero e testemunhas de suscetibilidade (Ikeda) e resistência (BRS Acará) ao longo do tempo, em função da inoculação com PVY, PepYMV e PMMoV. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Tabela 6. Ocorrência de sintomas em linhagens avançadas de pimenta Habanero inoculadas com *Potato virus Y* (PVY), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) e confirmação da infecção através de teste sorológico (Dot-Elisa) aos 20 dias após a inoculação. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	Total de plantas inoculadas	Nº de plantas com sintomas			Dot-Elisa		
		PVY	PepYMV	PMMoV	PVY	PepYMV	PMMoV
CNPH 15.737	8	0	8	8	0	8	8
CNPH 15.740	8	0	8	8	0	8	8
CNPH 15.744	8	8	8	8	8	8	8
CNPH 15.745	8	3	5	8	3	5	8
CNPH 15.749	8	0	8	8	0	8	8
CNPH 15.750	8	8	8	8	8	8	8
BRS Acará	8	0	0	8	0	0	8
Ikeda	8	8	8	8	8	8	8

O uso de cultivares resistentes é a forma mais adequada de controle de doenças devido ao seu baixo custo, alta eficiência e reduzido dano ambiental, especialmente quando comparado a outras estratégias que visam controlar o patógeno após o seu estabelecimento (Rossato *et al.* 2018).

4. Conclusão

O presente estudo identificou linhagens de pimenta do tipo Habanero com níveis altos e intermediários de resistência a *R. pseudosolanacearum*, *P. capsici*, *Meloidogyne* spp., *X. euvesicatoria* e aos vírus PVY, PepYMV e PMMoV. CNPH 15.737 e CNPH 15.740 mostraram-se altamente resistente aos isolados de *R. pseudosolanacearum*, a PVY e *M. javanica* (Tabela 7). As linhagens também apresentaram nível moderado de resistência a *P. capsici* e a *M. incognita* raça 1 pelo índice de reprodução.

CNPH 15.749 apresentou alta resistência a PVY, *M. javanica* e resistência moderada ao isolado Pcp 116 de *P. capsici* e *M. enterolobii*. Pelo índice de reprodução, a linhagem CNPH 15.749 mostrou-se muito resistente a *M. incognita* raça 1.

CNPH 15.744 apresentou resistência a *M. incognita* raça 1 pelo FR. CNPH 15.750 foi considerada moderadamente resistente a *X. euvesicatoria*.

Merece destaque especial a linhagem CNPH 15.740, com nível elevado de resistência aos isolados de Rp, PVY e Mj, e intermediário a Pc e Mi.

Tabela 7. Resumo das reações baseadas na área total abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para *R. pseudosolanacearum*, *P.capsici* e *X. euvesicatoria*; no fator de reprodução (FR) e índice de reprodução (IR) para *M. javanica*, *M. incognita* raça 1 e *M. enterolobii* e na ocorrência das espécies de vírus PVY, PepYMV, PMMOV em linhagens avançadas de pimenta Habanero e testemunhas de resistência e suscetibilidade. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	<i>R. pseudosolanacearum</i>			<i>P.capsici</i> ²	<i>M. javanica</i>		<i>M. incognita</i> raça 1		<i>M. enterolobii</i>		<i>X. euvesicatoria</i>	Vírus		
	CNPB RS476	CNPB RS634	CNPB RS639	Pcp 116	FR	IR	FR	IR	FR	IR	EH 112-P	PVY	PePYMV	PMMOV
CNPB 15.737	0,6 Cb ¹	5,9 Ca	3,3 Cab	7,2 c ³	0,12 R ⁴	1,13 MR ⁵	1,55 S	6,67 MR	19,9 S	93,0 S	9,6 ab	R ⁶	S	S
CNPB 15.740	0 Cb	6,0 Ca	2,4 Cab	6,3 c	0,12 R	1,13 MR	2,02 S	8,69 MR	17,7 S	82,7 S	7,4 cd	R	S	S
CNPB 15.744	3,3 BCb	10,5 BCa	4,8 BCb	11,8 b	0,03 R	0,28 AR	0,06 R	0,25 AR	11,3 S	53,0 S	9,1 ab	S	S	S
CNPB 15.745	6,3 Bb	12,9 ABa	15,1 Aa	8,1 bc	0,04 R	0,37 AR	1,77 S	7,62 MR	9,7 S	45,3 LR	9,9 ab	S	S	S
CNPB 15.749	6,3 Bb	11,1 Ba	8,8 Bab	1,1 de	0,17 R	1,60 MR	1,46 S	6,28 MR	4,0 S	18,6 MoR	6,6 cd	R	S	S
CNPB 15.750	11 Ab	16,9 Aa	17,0 Aa	8,7 bc	0,14 R	1,32 MR	22,04 S	94,8 S	19,3 S	90,2 S	4,7 d	S	S	S
Pimentão Tico ⁷	13 Aa	14,3 ABa	15,3 Aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CNPB 143 ⁸	0 Ca	0 Da	0 Ca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ikeda ⁹	-	-	-	15,3 a	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S
CNPB 148 ¹⁰	-	-	-	0 e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BRS Acara ¹¹	-	-	-	-	0 R	0 I	0 R	0 I	10,2 S	47,4 S	-	R	R	S
Tomateiro ¹²	-	-	-	-	10,6 S	100 S	23,24 S	100 S	21,4 S	100 S	-	-	-	-
CNPB 189 ¹³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 e	-	-	-
Magali R ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-

¹Média seguida pela mesma letra maiúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos (p<0,05), pelo teste de Tukey; Média seguida pela mesma letra minúscula na linha não diferencia significativamente os isolados de *R. pseudosolanacearum* (p<0,05), pelo teste de Tukey;

²Médias referentes AACPD para o parâmetro murcha das folhas;

³Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos de *Capsicum* (p<0,05), pelo teste de Tukey;

⁴Reações de resistência com base no fator de reprodução (R: plantas resistentes; S: plantas suscetíveis);

⁵Reação de resistência com base no índice de reprodução (I: imune; AR: altamente resistente; MR: muito resistente; MoR: moderadamente resistente; LR: ligeiramente resistente; S: suscetível);

⁶Reação de resistência (R) e suscetibilidade (S) às espécies de vírus PVY, PePYMV, PMMOV;

⁷Padrão de suscetibilidade a isolados de *R. pseudosolanacearum*;

⁸Padrão de resistência a isolados de *R. pseudosolanacearum*;

⁹Padrão de suscetibilidade a *P.capsici*, PVY, PepYMV e PMMOV;

¹⁰Padrão de resistência a *P.capsici*;

¹¹Padrão de resistência a *M. javanica*; *M. incognita* raça 1 e *M. enterolobii*;

¹²Padrão de suscetibilidade a *M. javanica*; *M. incognita* raça 1 e *M. enterolobii*;

¹³Padrão de resistência a *X. euvesicatoria*;

¹⁴Padrão de suscetibilidade a *X. euvesicatoria*.

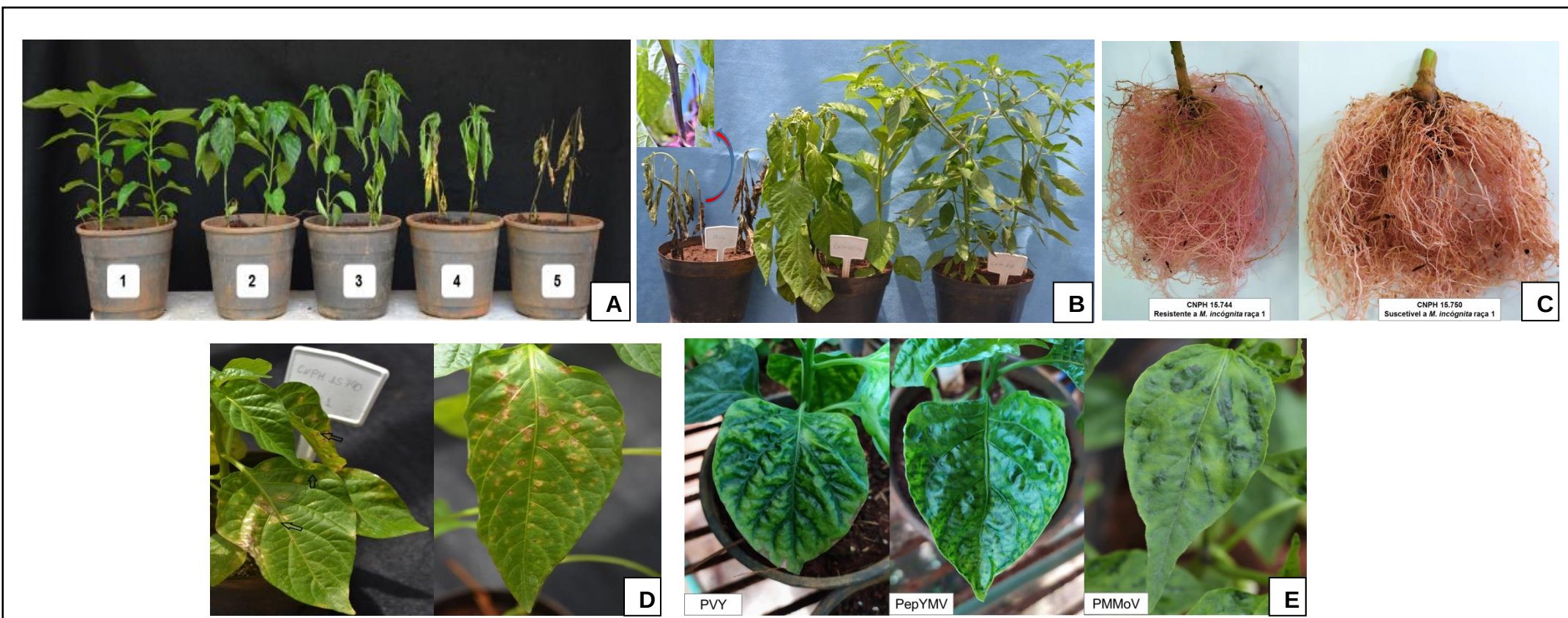


Figura 5. **A** – Sintomas de *R. pseudosolanacearum* em plantas de pimenta Habanero. Representação da escala de notas de Winstead & Kelman (19521), onde 1 = sem sintomas visíveis; 2 = 1-25% das plantas murchas; 3 = 26-50% de murcha; 4 = 51-75% de murcha; e 5 = mais de 75% de murcha. **B** – Sintomas de *P. capsici* (necrose na base do caule e murcha das folhas). **C** – Raízes de plantas de pimenta Habanero resistente (esquerda - sem galhas) e suscetível (direita - presença de massa de ovos e galhas), respectivamente, aos nematoides das galhas (*M. incognita* raça 1). **D** - Sintomas de *X. euvisicatoria* (lesões necróticas nas folhas). **E** – Sintomas em plantas de pimenta associadas aos vírus PVY (coloração verde-escuro nas nervuras principais e mosqueado); PepYMV (mosaico amarelo e mosqueado); PMMoV (mosqueado e mosaico verde-amarelo). Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

4. Referências

- ANTIGNUS, Y; LACHMAN, O; PEARLSMAN, M; MASLENIN, L; ROSNER, AA. 2008. New Pathotype of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) Overcomes the L4 Resistance Genotype of Pepper Cultivars. *Plant Disease* 92:1033-1037.
- AREAS MS, GONÇALVES RM, SOMAN JM, SILVA JC, SOUZA-FILHO RC, SILVA JUNIOR TAF; GIORIA R; MARINGONI AC. 2015. Prevalence of *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper in Brazil. *Journal Phytopathology* 163: 1050-1054.
- AREAS, MS; GONÇALVES, RM; SOMAN, JM; FILHO, RCS. 2018. Resistance of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from Brazilian pepper to copper and zinc sulfates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90: 2375-2380.
- BARBOSA, JC; MALDONADO JÚNIOR, W. 2015. Experimentação Agronômica & AgroEstat: Sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Jaboticabal: UNESP, 396 p.
- BARCHENGER, DW; LAMOUR, KH; SHEU, Z; SHRESTHA, S; KUMAR, S; LIN, S; BURLAKOTI, R; BOSLAND, PW. 2017. Intra- and intergenomic variation of ploidy and clonality characterize *Phytophthora capsici* on *Capsicum* sp. in Taiwan. *Mycological progress* 16:955–963.
- BARCHENGER, DW; LAMOUR, KH; BOSLAND, PW. 2018. Challenges and Strategies for Breeding Resistance in *Capsicum annuum* to the Multifarious Pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-16.
- BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Society of London, serie A, London, 160:268-282, 1937.
- BENTO, CS; RODRIGUES, R; GONÇALVES, LSA; OLIVEIRA, HS; 2013. Inheritance of resistance to *Pepper yellow mosaic virus* in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genetics and Molecular Research* 12: 1074-1082.
- BOITEUX, LS; NAGATA, T. 1993. Susceptibility of *Capsicum chinense* PI 159236 to *Tomato Spotted Wilt Virus* Isolates in Brazil. *Plant disease* 77: 210F.

BOSLAND, PW; COON, D. 2015. 'NuMex Trick-or-Treat', a no-heat Habanero pepper. *HortScience* 50: 1739–1740.

BUCKI, P; PARAN, I; GANOT, L; OZALVO, R; IBERKLEID, I; MIYARA, SB. 2017. Pathogenic variability of *Meloidogyne incognita* populations occurring in pepper-production greenhouses in Israel toward Me1, Me3 and N pepper resistance genes. *Plant disease* 101:1391– 1401.

CARNEIRO, RMDG; ALMEIDA, MRA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25: 35- 44.

CASTRO-CONCHA, LA; TUYUB-CHE, J; MOO-MUKUL, A; VAZQUEZ-FLOTA, FA; MIRANDA-HAM, ML. 2014. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal* 195: 1-5.

CHANGKWIAN, A; VENKATESH, J; LEE, J-H; HAN, J-W; KWON, J-K; SIDDIQUE, MI; SOLOMON, AM; CHOI, G-J; KIM, E; SEO, Y; KIM, Y-H; KANG B-C. 2019. Physical Localization of the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) Resistance Locus Me7 in Pepper (*Capsicum annuum*). *Frontiers in Plant Science*. 10: 886-893.

CHARCHAR, JM; GONZAGA, V; GIORDANO, LB; BOITEUX, LS; REIS, NVB; ARAGÃO, FAS. 2003. Reações de cultivares de tomate à infecção por população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em estufa plástica e campo. *Nematologia Brasileira* 27: 49-54.

CHOI, S; CHOI, G; KWON, S; YOON, J. 2016. Complete Nucleotide Sequences and Genome Organization of Two *Pepper Mild Mottle Virus* Isolates from *Capsicum annuum* in South Korea. *Genome Announc* 4:e00411-16.

CEZAR, MA; KRAUSE-SAKATE, R; PAVAN, AA; COSTA, CP. 2009. Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de *Capsicum* spp. *Summa Phytopathology* 35: 39-43.

CLARK, MF; ADAMS, AN. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475-83.

COELHO NETTO, RA; PEREIRA, BG; NODA, H; BOHER, B. 2004. Murcha bacteriana no Estado do Amazonas, Brasil. *Fitopatologia brasileira* 29: 21-27.

COSTA, RA; RODRIGUES, R; SUDRÉ, CP. 2002. Resistência genética à mancha-bacteriana em genótipos de pimentão. *Horticultura Brasileira* 20: 86-89.

DERI, BB; PAJIĆB, V; DUDIĆ, D. 2018 Revealing new information from existing genomic data for *pepper mild mottle virus* pathotype determination. *Crop Protection* 107 93–103.

DICKSON, DW; STRUBLE, FB. 1965. A sievingstaining technique for extraction of egg mass of *Meloidogyne incognita* from soil. *Phytopathology* 55: 497.

DUNN, AR; LANGE, HW; SMART, CD. 2014. Evaluation of commercial bell pepper cultivars for resistance to phytophthora blight (*Phytophthora capsici*). *Plant health progress* 15: 19-24.

DUTTA, B; GITAITIS, R; SANDERS, H; BOOTH, C; SMITH, S; LANGSTON, D. B. 2013. Role of blossom colonization in pepper seed infestation by *Xanthomonas euvesicatoria*. *Phytopathology* 104: 232-239.

FERREIRA, DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 1039-1042.

GILARDI, G; BAUDINO, M; MOIZIO, M; PUGLIESE, M; GARIBALDI, A; GULLINO, M.L. 2013. Integrated management of *Phytophthora capsici* on bell pepper by combining grafting and compost treatment. *Crop Protection* 53: 13-19.

GHULE, TM; SINGH, A; KHAN, MR. 2014. Root Knot Nematodes: Threat to Indian Agriculture. *Popular Kheti* 2: 126-130.

GONÇALVES, LSA; GOMES, VM; ROBAINA, RR; VALIM, R.; RODRIGUES, R; ARANHA, FM. 2014. Resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne enterolobii*) in *Capsicum* spp accessions. *Revista Agrária* 9: 49-52.

GRANKE, LL; QUESADA-OCAMPO, L; LAMOUR, KH; HAUSBECK, MK. 2012. Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Disease* 96: 1588–1600.

HONG, JC; NORMAN, DJ; REED, DL; MOMOL, MT; JONES, JB. 2012. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. *Phytopathology* 102: 924–936.

HUANG, SP; MIRANDA, JEC; MALUF, WR. 1986. Resistance to root-knot nematodes in a Brazilian sweet potato collection. *Fitopatologia Brasileira* 11: 761-767.

HUSSEY, RS; BARKER, KRA. 1973. comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1.025-1.028.

JANZAC, B; FABRE, MF; PALLOIX, A; MOURY, B. 2009. Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against potyviruses, and selection of virulent variants. *Plant Pathology* 58: 443–449.

JARQUE, C; BERA, A. 1987. A test for normality of observations and regression residuals. *International Statistical Review* 55: 163–172.

JONES, J. B., LACY, G. H., BOUZAR, H., STALL, R. E., & SCHAAD, N.W. 2006. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, Erratum: *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 85–86.

KIM, HJ; HAN, JH; YOO, JH; CHO, HJ; KIM, BD. 2008: Development of a sequence characteristic amplified region marker linked to the L4 locus conferring broad spectrum resistance to tobamoviruses in pepper plants. *Molecular Cells* 25, 205–210.

- KIM, S; LEE, H; SEO, S; LEE, JH; CHOI, D. 2015. RNA-Dependent RNA Polymerase (NIb) of the Potyviruses is an Avirulence Factor for the Broad-Spectrum Resistance Gene Pvr4 in *Capsicum annuum* cv. CM334. *PLoS ONE* 10: e0119639.
- KIM, S; KANG, W; HUY, HN; YEOM, S; AN, J; KIM, S. 2017. Divergent evolution of multiple virus-resistance genes from a progenitor in *Capsicum* spp. *New Phytologist* 213: 886–899.
- LEBEAU, A; DAUNAY, MC; FRARY, A; PALLOIX, A; WANG, JF; DINTINGER, J; CHIROLEU, F; WICKER, E; PRIOR, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: Genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101:154-165.
- LIMA, MF; INOUE-NAGATA, AK; REIFSCHNEIDER, FJB; SOUZA, KRR; ULHOA, AB. 2013. Detection, Occurrence and Natural Incidence of *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV) in Hot Peppers in Brazil. *Acta Horticulturae* 917: 269-274.
- LOPES, CA; BOITEUX, LS. 2004. Biovarspecific and broad-spectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4: 350-355.
- LOPES, CA; BOITEUX, LS; ESCHEMBACK, V. 2015. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. *Horticultura Brasileira* 33: 125-130.
- LUCINDA, N; ROCHA, WB; INOUE-NAGATA, AK; NAGATA, T. 2012. Complete genome sequence of *Pepper yellow mosaic virus*, a potyvirus, occurring in Brazil. *Archives of Virology* 157: 1397-1401.
- MADEIRA, NR; AMARO, GB; MELO, RAC; RIBEIRO, CSC; REIFSCHNEIDER, FJB. 2016. Compatibilidade de porta-enxertos para pimentão em cultivo protegido. *Horticultura Brasileira* 34: 470-474.
- MATSUNAGA, H; SAITO, T; HIRAI, M; NUNOME, T; YOSHIDA, T. 2003. DNA markers linked to *pepper mild mottle virus* (PMMoV) resistant locus (L4) in

Capsicum. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 72: 218–220.

MOTA, FC; ALVES, GCS; GIBAND, M; GOMES, ACMM; SOUSA, FR; MATTOS, VS; BARBOSA, VHS; BARROSO, PAV; NICOLE, M; PEIXOTO, JR; ROCHA, MR; CARNEIRO, RMDG. 2013. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defense mechanisms. *Plant Pathology* 6: 1.173-1.183.

MOODLEY, V; NAIDOO, R; GUBBA, A; MAFONGOYA, PL. 2019. Development of *Potato virus Y* (PVY) resistant pepper (*Capsicum annuum* L.) lines using marker-assisted selection (MAS). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 105: 1067-1073.

MOULIN, MM; RODRIGUES, R; RIBEIRO, SFF; GONÇALVES, LSA; BENTO, CS. 2014. Trypsin inhibitors from *Capsicum baccatum* var. *pendulum* leaves involved in Pepper yellow mosaic virus resistance. *Genetics and Molecular Research* 13: 9229-9243.

NASS, LL; SOUZA, KRR; RIBEIRO, CSC; REIFSCHNEIDER, FJB. 2015. Synthesis of a base population of Habanero pepper. *Horticultura Brasileira* 33: 530-532.

NARESH, P; MEENU, K; ACHARYA, GC; REDDY, AC; LAKSHMANA, DCR. 2019. Genetics and molecular markers for resistance to major soil borne pathogens in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Research Journal of Biotechnology* 14: 101-105.

OLIVEIRA, CD; BRAZ, LT; SANTOS, JM; BANZATTO, DA; OLIVEIRA, PR. 2009. Resistência de pimentas a nematoides de galha e compatibilidade enxerto/portaenxerto entre híbridos de pimentão e pimentas. *Horticultura Brasileira* 27: 520-526.

OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen, Wageningen* 66: 1-46,

- OSDAGHI, E; TAGHAVI, SM; HAMZEHZARGHANI, H; LAMICHLANE, JR. 2016. Occurrence and characterization of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper in Iran. *Journal of Phytopathology* 164: 722-734.
- ÖZKAYNAK, E; DEVRAN, Z; KAHVECI, E; DOĞANLAR, S; BAŞKÖYLÜ, B; DOĞAN, F; YÜKSEL, M. 2014. Pyramiding Multiple Genes for Resistance to PVY, TSWV and PMMoV in Pepper Using Molecular Markers. *European Journal of Horticultural Science* 79: 233–239.
- PETRY, R; PAZ-LIMA, ML; BOITEUX, LS; CAFÉ-FILHO, AC; REIS, A. 2016. Reaction of *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm to *Phytophthora capsici*. *European Journal of Plant Pathology* 148: 481–489.
- PINHEIRO, JB; REIFSCHNEIDER, FJB; PEREIRA, RB; MOITA, AW. 2013. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em *Capsicum* spp. *Nematologia Brasileira* 37: 20-25.
- PINHEIRO, JB; REIFSCHNEIDER, FJB; PEREIRA, RB; MOITA, AW. 2014. Reação de genótipos de *Capsicum* ao nematoide das galha. *Horticultura Brasileira* 32: 371-375.
- PINHEIRO, JB; BOITEUX, LS; ALMEIDA, MRA; PEREIRA, RB; GALHARDO, L CS; CARNEIRO, RMDG. 2015. First Report of *Meloidogyne enterolobii* in *Capsicum* Rootstocks Carrying The Me1 and Me3/Me7 Genes in Central Brazil. *Nematropica* 45:184-188.
- PONTES, NC; MOITA, AW; QUEZADO-DUVAL, AM. 2012. Estabilidade da resistência de ‘Ohio 8245’ e ‘Heinz 9553’ à mancha bacteriana do tomateiro. *Horticultura Brasileira* 30: 99-105.
- POTNIS, N; TIMILSINA, S; STRAYER, A; SHANTHARAJ, D; BARAK, JD; PARET, ML. 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology* 16: 907–920.

POTNIS, N; BRANHAM, SE; JONES, JB; WECHTER, WP. 2019. Genome-wide Association Study of Resistance to *Xanthomonas gardneri* in USDA Pepper (*Capsicum*) Collection. *Phytopathology* 109: 1217-1225.

REEVES, G; MONROY-BARBOSA, A; BOSLAND, PW. 2013. A Novel *Capsicum* Gene Inhibits Host-Specific Disease Resistance to *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 103: 472-478.

REZENDE, JF; LEITE, ME; NOGUEIRA, DW; NOGUEIRA, DG; SILVA, AA; MALUF, WR. 2019. A new resistance gene to PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*) in *Capsicum annuum* L. *Plant Breeding* 139:1–8.

RIBEIRO, CSC; BOSLAND, PW. 2012. Physiological race characterization of *Phytophthora capsici* isolates from several host plant species in Brazil using New Mexico recombinant inbred lines of *Capsicum annuum* at two inoculum levels. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 137: 421-426.

RIBEIRO, CSC; SOUZA, KRR; CARVALHO, SIC; REIFSCHNEIDER, FJB. 2015. BRS Juruti: the first Brazilian Habanero-type hot pepper cultivar. *Horticultura Brasileira* 33: 527-529.

ROACH, R; MANN, R; GAMBLEY, CG; SHIVAS, RG; RODONI, B. 2018. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, *Capsicum* and chilli crops in eastern Australia. *European Journal of Plant Pathology* 150: 595–608.

ROSSATO, M; SANTIAGO, TR; LOPES, CA. 2018. Reaction of *Capsicum* peppers commercialized in the Federal District to bacterial wilt. *Horticultura Brasileira* 36: 173-177.

SÁNCHEZ-CHÁVEZ, E; SILVA-ROJAS, HV; LEYVA-MIR, G; VILLARREAL-GUERRERO, F; JIMÉNEZ-CASTRO, JA; MOLINA-GAYOSSO, E; GARDEA-BÉJAR, AA; ÁVILA-QUEZADA, GD. 2017. An effective strategy to reduce the incidence of *Phytophthora* root and crown rot in bell pepper. *Interciencia* 42: 229-235.

SCHOLTHOF, KBG; ADKINS, S; CZOSNEK, H; PALUKAITIS, P; JACQUOT, E; HOHN, T; HOH, .; SAUNDERS, K; CANDRESSE, T; AHLQUIST, P; HEMENWAY, C; FOSTER, GD. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938–954.

SCOTT, JW; JONES, JB; SOMODI, GC; STALL, RE. 1995. Screening tomato accessions for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Race T3. *HortScience*, 30: 579-581.

SHANER, G; FINNEY, RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67, 1051-1056.

SILVA, LRA; RODRIGUES, R; PIMENTA, S; CORREA, JWS; ARAÚJO, MSB; BENTO, CS; SUDRÉ, CP. 2017. Inheritance of bacterial spot resistance in *Capsicum annuum* var. *annuum*. *Genetics and Molecular Research* 16: gmr16029631.

SOARES, RS; SILVA, EHC; VIDAL, RL; CANDIDO, WS; FRANCO, CA; REIFSCHNEIDER, FJB; BRAZ, LT. 2018. Response of *Capsicum annuum* L. var. *annuum* genotypes to root-knot nematode infection. *Chilean Journal of Agricultural Research* 78: 78-85.

STEINER, OSR; BOSLAND, PW. 2008. Recombinant inbred line differential identifies race-specific resistance to *Phytophthora* Root Rot in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 98: 867 – 870.

TAYLOR, A. L. 1967. Introduction to research on plant nematology: an FAO guide to the study and control of the plant-parasitic nematodes. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 133p.

TEODORO AFP; ALVES RBN; RIBEIRO LB; REIS K; REIFSCHNEIDER FJB; FONSECA MEN; SILVA JP; AGOSTINI-COSTA TS. 2013. Vitamin C content in Habanero pepper accessions (*Capsicum chinense*). *Horticultura Brasileira* 31: 59-62.

- VÁZQUEZ, PV; CORTEZ, MCN. 2018. Use of organic alternatives in the production system of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) under greenhouse conditions. *African Journal of Agricultural Research* 13: 1091-1094.
- WANG, X; FAZARI, A; CAO, Y; ZHANG, Z; PALLOIX, A. 2018. Fine mapping of the root-knot nematode resistance gene Me1 in pepper (*Capsicum annuum* L.) and development of markers tightly linked to Me1. *Molecular Breeding* 38: 1-10.
- WICKER, E; GRASSART, L; CORANSON-BEAUDU, R; MIAN, D; GUILBAUD, C; FEGAN, M. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6790–6801.
- WINSTEAD, NN; KELMAN, A. 1952. Inoculation techniques for evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42:628–634.
- YANG, B.; EISENBACK, J. D. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n.sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpot tree in China. *Journal of Nematology* 15: 381-391.

CAPÍTULO 4 - NOVAS LINHAGENS BRASILEIRAS DE PIMENTA HABANERO (*Capsicum chinense*): CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E BIOQUÍMICA EM DIFERENTES AMBIENTES

(Este capítulo foi publicado na revista *Scientia Horticulturae* DOI - <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108941>. A formatação deste capítulo segue as normas da revista).

RESUMO

A pimenta Habanero é conhecida pela diversidade de características morfológicas e por seus atributos bioquímicos. A demanda internacional crescente por esse tipo de pimenta é uma oportunidade para o Brasil. Para atender essa demanda, faz-se necessário o desenvolvimento de novas cultivares com elevada qualidade de frutos e adaptadas as condições de cultivo brasileiros. O objetivo deste estudo foi caracterizar morfoagronômica e físico-bioquimicamente novas linhagens de pimenta Habanero cultivadas em diferentes ambientes e investigar a interação genótipo x ambiente, visando fornecer subsídios para o processo de registro de novas cultivares e posterior lançamento. Três linhagens avançadas e duas cultivares comerciais testemunhas foram cultivadas em três diferentes ambientes de cultivo, dois em campo aberto e um em ambiente protegido. A caracterização das linhagens baseou-se em nove caracteres morfoagronômicas, oito físico-bioquímicos e incidência das cinco principais viroses em plantas cultivadas em campo aberto. As três novas linhagens apresentaram características importantes e desejáveis, como alta produtividade, tamanho adequado de plantas (100.0–150.0 cm) e qualidade superior de frutos em ambiente protegido (CNPH 15.744); potencial de cultivo em campo aberto com alto rendimento (35.0 a 40.0 t ha⁻¹; CNPH 15.749 e CNPH 15.740) e superioridade nas características dos frutos, menor acidez titulável total (15–22%) e ausência *Potato virus Y* (CNPH 15.740). As linhagens CNPH 15.740, CNPH 15.744 e CNPH 15.749 apresentam potencial para serem submetidas ao processo de registro de cultivares, obrigatório no sistema agrícola brasileiro, e lançadas como novas cultivares de pimenta Habanero desenvolvidas e adaptadas para o Brasil, aumentando as opções

para a cadeia produtiva e para os consumidores intermediários e finais. CNPH 15.744 apresentou qualidades sensoriais únicas para pimenta Habanero.

Palavras-chave: ambiente protegido, campo aberto, registro de cultivares, novas cultivares, qualidade sensorial.

NEW BRAZILIAN LINES OF HABANERO PEPPER (*Capsicum chinense*): MORPHO-AGRONOMIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION IN DIFFERENT ENVIRONMENTS

ABSTRACT

Habanero pepper is known for the diversity of its morphological characteristics and its biochemical attributes. The growth of international demand for this type of pepper is an additional opportunity for Brazilian farmers and processing industries. In order to meet this demand, it is necessary to develop new cultivars with high fruit quality and adaptation to the Brazilian growing conditions. The objective of this study was to carry out a morpho-agronomic and physical-biochemical characterization of new lines of Habanero pepper cultivated in different environments, and to investigate the genotype x environment interaction, aiming to provide subsidies for the registration process of the new cultivars, and their subsequent release. Three advanced endogamic lines and two commercial cultivars, as control, were grown in three different growing environments, two in open field and one in protected environment. The characterization of the lines was based on nine morpho-agronomic and nine physical-biochemical descriptors and field-incidence of the five main virus diseases. The three new lines presented important and desirable characteristics such as high yield, adequate plant size (100.0–150.0 cm) and superior quality of fruits in protected environment (CNPH 15.744); open field cultivation potential with high yield (35.0 to 40.0 t ha⁻¹; CNPH 15.749 and CNPH 15.740); and superiority for fruit characteristics, lower total titratable acidity (15–22 %) and absence of Potato virus Y (CNPH 15.740). CNPH 15.740, CNPH 15.744 and CNPH 15.749 lines present the potential to be submitted to the cultivar

registration process, mandatory in the Brazilian agricultural system, and released as new Habanero pepper cultivars developed in and adapted to Brazil, increasing the options for pepper value chain and for intermediate and final consumers. CNPH 15.744 presented unique sensory qualities for a *C. chinense* Habanero.

Keywords: Protected environment, Open field, Cultivars registration, New cultivars, Sensory qualities.

1. Introdução

O gênero *Capsicum* compreende um grupo altamente diversificado de pimentas e pimentões que se originaram dos trópicos do continente americano (Reifschneider, 2000). Das 35 espécies descritas, apenas cinco são domesticadas (*C. annuum* L. var. *annuum*; *C. frutescens* L.; *C. baccatum* var. *pendulum* (Wild.) Eshbaugh; *C. pubescens* L.; e *C. chinense* Jacquin), apresentando importante impacto econômico e social em todo o mundo (Kim et al., 2014).

Capsicum chinense tem como centro de diversidade a Bacia Amazônica (Pozzobon et al., 2015). Diversos tipos morfológicos são descritos em decorrência da elevada variabilidade genética existente na espécie, evidenciada principalmente nos frutos que podem ter diferentes formatos, colorações, tamanhos e níveis de pungência, destacando-se as pimentas conhecidas como de-cheiro, bode, cumari-do-Pará, biquinho e Habanero (Lannes et al. 2007).

A pimenta do tipo Habanero é usada como um ingrediente importante na culinária de países como México, China, Tailândia e Coreia do Sul (Nass et al., 2015). É popularmente conhecida por sua elevada pungência, podendo variar de 250.000 a 700.000 unidades Scoville (SHU), e pela diversidade de características morfológicas apresentadas pelas suas plantas e frutos (Ribeiro et al., 2015), além de apresentar frutos com aromas únicos (Butcher et al., 2012). O tamanho de seus frutos varia entre 2,9 e 6,0 cm de comprimento por 2,5 a 4,6 cm de largura, pesando de 7 a 12 g (Ribeiro et al., 2015). A pimenta

Habanero também se destaca quanto aos seus atributos nutricionais. Seus frutos são fontes de compostos fitoquímicos importantes para a dieta humana, tais como vitamina C (Teodoro et al., 2013), capsaicinoides (Canto-Flick et al., 2008; Sweat et al., 2016; Jeeatid et al., 2018), compostos fenólicos (Ornelas-Paz et al., 2010; Campos et al., 2013), carotenoides (Menichini et al., 2009; Giuffrida et al., 2013; Gómez-García & Choa-Alejo, 2013), flavonoides (Butcher et al., 2012) e outros metabólitos secundários com propriedades antioxidantes, que reduzem o risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas (Castro-Concha et al., 2014).

O cultivo de pimenta Habanero é realizado principalmente em regiões tropicais e subtropicais (López-Puc et al., 2009), mas esse tipo de pimenta ainda é pouco conhecido no Brasil (Ribeiro et al., 2015). No entanto, a demanda por pimenta Habanero processada na forma de pastas e molhos tem crescido no mercado internacional, particularmente nos Estados Unidos da América e na Europa, e a agroindústria brasileira tem se mostrado interessada em suprir parte dessa demanda (Pereira et al., 2015).

As primeiras cultivares de pimenta Habanero adaptadas às condições de cultivo brasileiras, BRS Juruti (frutos com coloração vermelha) e BRS Nandaia (frutos com coloração alaranjada), foram disponibilizadas pela Embrapa Hortaliças ao mercado em 2016. Adicionalmente, como parte do esforço para atender à demanda crescente por novas cultivares, um programa de melhoramento foi desenvolvido com através do estabelecimento de uma população base de ampla variabilidade genética e consecutivos ciclos de autofecundação e seleção de plantas individuais com teste de progênie, obtendo-se, ao final, três linhagens endogâmicas, altamente produtivas, resistentes às principais doenças da cultura, com excelentes qualidades nutricionais e adaptação às condições tropicais de cultivo. Essas três linhagens, junto com 'BRS Juruti' e 'BRS Nandaia', constituíram o objeto do presente estudo.

A caracterização de linhagens avançadas é um passo fundamental nas fases finais de um programa de melhoramento. Esta etapa tem como finalidade avaliar o potencial produtivo do novo material genético, seu comportamento em

cada ambiente passível de cultivo, além de outras características de interesse do produtor e do mercado consumidor (Faleiro et al., 2008), servindo também como fonte de informação para o processo de registro de cultivares (Marinho et. al., 2011), obrigatório no sistema agrícola brasileiro.

A expressão de determinadas características morfológicas e bioquímicas pode estar atribuída ao efeito genético, bem como à ação dos fatores bióticos (pragas e doenças) e abióticos (umidade, temperatura, intensidade luminosa) e pela interação entre os fatores genéticos e ambientais (interação genótipo x ambiente) (Des Marais et al., 2013). Uma interação genótipo x ambiente significativa faz com que características, tais como nível de pungência (Gurung et al., 2012), se alterem em diferentes ambientes, podendo causar uma mudança na classificação relativa dos genótipos. Compreender a relação entre os efeitos do ambiente sobre o genótipo e sua interação é fundamental para a escolha de cultivares mais adaptadas aos diferentes ambientes ou regiões de cultivo (Jeeatid et al., 2018).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfoagronômica e físico-bioquimicamente as novas linhagens avançadas de pimenta Habanero do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças cultivadas em diferentes ambientes e investigar a interação genótipo x ambiente, visando fornecer subsídios para o processo de registro e lançamento de novas cultivares, bem como fornecer informações técnicas das novas cultivares aos atores da cadeia produtiva de pimentas.

2. Material e métodos

2.1 Material e delineamento experimental

Três linhagens endogâmicas de pimenta Habanero (CNPH 15.740, CNPH 15.744 e CNPH 15.749) provenientes do programa de melhoramento de *Capsicum* spp. da Embrapa Hortaliças e as cultivares comerciais BRS Nandaia e BRS Juruti foram avaliadas. Três experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e campo aberto, localizados em Brasília, Distrito Federal, Brasil, 15°55'59.8" W e 48°08'34.2" S, com altitude de 990 m, em dois períodos: Verão/Outono de 2018 (janeiro a julho de 2018), ensaios em campo aberto

(AMB 1) e em telado (AMB 2), e Primavera/Verão de 2018/2019 (outubro de 2018 a fevereiro de 2019), ensaio somente em campo aberto (AMB 3). As descrições dos períodos de cultivo, bem como os dados climáticos estão relacionadas na Tabela 1. A produção de mudas, o preparo do solo e as práticas culturais e de manejo foram realizados com base nas recomendações para o cultivo de pimenta propostas por Ribeiro et al. (2008).

As mudas foram produzidas em bandejas de poliestireno de 72 células com substrato comercial Carolina® e mantidas em telado. Com base na análise química do solo e de acordo com as recomendações de Ribeiro (2008), 6.800 kg ha⁻¹, 3.000 kg ha⁻¹ e 4.500 kg ha⁻¹ de calcário mineral foram utilizados nos AMB 1, AMB 2 e AMB 3, respectivamente. Uma semana antes do transplante, 200 kg ha⁻¹ e 135 kg ha⁻¹ do fertilizante 4-14-8 (NPK) foram incorporados ao solo em AMB 1 e AMB 3, respectivamente. No AMB 2, 20 gramas por metro linear de Osmocote ©, NPK (18-5-9) e micronutrientes foram incorporados ao solo. A adubação da cobertura foi realizada quinzenalmente, aplicando 8 g de N e 3 g de K₂O por planta em todos os ambientes, utilizando como fontes ureia e cloreto de potássio. O controle de plantas daninhas foi realizado por meio de capina manual e, para pragas e doenças, o controle químico foi realizado quando necessário.

Tabela 1. Descrição dos ambientes, períodos de cultivo, local e dados climáticos dos três ensaios de caracterização morfoagronômica e bioquímica de linhagens de pimenta Habanero. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Ambientes	Período	Temperatura do ar (°C)		Umidade relativa (%)		Intensidade luminosa (lum/ft ²)
		Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	
AMB 1 (Campo aberto)	Janeiro a julho de 2018	29,6	9,4	95,0	22,0	1695
AMB 2 (Casa de vegetação)	Janeiro a julho de 2018	41,7	5,4	93,7	16,5	1299
AMB 3 (Campo aberto)	Outubro de 2018 a fevereiro de 2019	32,8	15,2	95,0	21,0	1558

O delineamento experimental utilizado em todos os ensaios foi blocos casualizados, com cinco tratamentos e três repetições. As unidades experimentais foram constituídas por 10 plantas por parcela, utilizando-se o espaçamento de 0,6 m entre plantas e de 1,0 m entre linhas.

2.2 Caracterização morfoagronômica

Linhagens e cultivares foram caracterizadas com base em nove descritores recomendados internacionalmente para o gênero *Capsicum* (IPGRI, 1995). As colheitas de frutos foram realizadas a cada 15 dias, entre maio e julho de 2018 (AMB 1 e AMB 2), e de janeiro a fevereiro de 2019 (AMB 3), totalizando quatro colheitas.

As características de planta e fruto foram analisadas para os seguintes descritores: 1) altura de planta (AP, em cm) e 2) largura de planta (LP, em cm), mensuradas em sua maior distância, quando as plantas da parcela apresentaram 50% de frutos maduros; 3) altura da primeira bifurcação (APB, em cm), mensurada da altura da base do solo até a primeira bifurcação, quando as plantas da parcela apresentaram 50% de frutos maduros; 4) comprimento de fruto (CF, em mm), mensurado da base até o maior comprimento do fruto; 5) largura de fruto (LF, em mm), mensurada transversalmente na parte central do fruto; 6) espessura da parede do fruto (EP, em mm), obtido medindo-se a largura do pericarpo na parte medial do fruto; 7) Número de lóculos (NL, unidade), calculado pelo número médio de lóculos por fruto; 8) número total de frutos por planta (NFP, unidade), estimado pela contagem de frutos maduros colhidos por planta em cada parcela e 9) produtividade total (PROD, em t ha⁻¹), calculada a partir da pesagem de todos os frutos de cada parcela em balança digital (marca Marte® AD4200, São Paulo, SP, Brasil) e o peso total foi extrapolado para tonelada por hectare. Os descritores AP, LP e APB foram mensurados com o auxílio de uma fita métrica metálica, considerando-se oito plantas centrais de cada parcela experimental e CF, LF e EP foram obtidos de 10 frutos por genótipo em cada parcela, utilizando-se um paquímetro digital (marca MITUTOYO®, modelo 500-144B). Os valores médios de cada característica foram considerados.

As linhagens e cultivares também foram avaliadas quanto à incidência natural (sem inoculação artificial) de cinco espécies de vírus em campo, no ensaio de Primavera/Verão de 2018/2019. A identificação de vírus foi realizada pelo teste Dot-Elisa (Clark & Adams, 1977) utilizando-se anti-soros policlonais contra *Tomato spotted wilt virus* (TSWV); *Groundnut ringspot virus* (GRSV); *Potato virus Y* (PVY); *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e *Pepper mild mottle virus* (PMMoV).

2.3 Caracterização físico-química

Para a avaliação dos componentes bioquímicos, foram escolhidas ao acaso 30 frutos de cada parcela. Para as análises de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, cor de fruto e vitamina C, foram utilizados frutos frescos avaliados logo após a colheita. Uma parte de todas as amostras foi acondicionada em recipientes plásticos, identificados e congelados em freezer, à temperatura aproximada de -20 °C, para quantificação posterior de capsaicinóides e carotenóides. Todas as análises laboratoriais foram realizadas em triplicata, seguindo-se as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

2.3.1 Parâmetros colorimétricos - Luminosidade (L^*), Cromaticidade (C^*) e ângulo hue ($^{\circ}\text{hue}$)

As medidas foram realizadas diretamente na superfície de 10 frutos de cada amostra, na região mediana do fruto, utilizando-se o colorímetro digital Konica Minolta® (Chromometer, CR-400) com 8 mm de diâmetro da área de medida do aparelho e com iluminação difusa (iluminante D65, ângulo de visão 0° e espaço cromático CIELAB). O aparelho foi calibrado no sistema Y, X, y com uma placa branca padrão de cerâmica ($Y = 91,59$; $X = 0,3147$; $y = 0,3311$). Os resultados foram obtidos com base nos padrões CIE- $L^* C^* h^{\circ}$.

2.3.2 pH e acidez total titulável (AT)

As medidas foram realizadas em titulador automático SI Analytics®, modelo TitroLine Easy. Amostras frescas de cada material (10g) foram homogeneizadas em 50mL de água destilada com o auxílio de um misturador

por três minutos e, em seguida, realizada a leitura direta do pH. Para a acidez titulável, foi utilizado o método 22.058 descrito pela AOAC (1992). Os resultados foram expressos em equivalente de ácido cítrico.

2.3.3 Sólidos solúveis totais (SST)

A quantificação foi realizada a partir de 10g de fruto de cada linhagem e cultivar, retirando-se o suco da polpa com o auxílio de um espremedor, colocando-se de uma a duas gotas de cada amostra diretamente no prisma de um refratômetro (marca Atago, modelo PAL-1), com leitura imediata, sendo os dados expressos em °Brix.

2.3.4 Vitamina C total

A determinação do conteúdo de ácido ascórbico foi baseada na metodologia descrita por Terada et al. (1979), com adaptações. O teor de vitamina C total foi quantificado por meio da leitura da absorbância a um comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro de UV-visível (Micronal®, B442), utilizando-se uma curva de calibração externa, de comportamento linear, estabelecida a partir de seis concentrações de ácido ascórbico (Sigma > 99%) entre 0,3 e 1,5 mg. mL⁻¹ ($r = 0,9999$); (CV <2%).

2.3.5 Determinação do teor de capsaicinóides

Amostras liofilizadas de frutos maduros (12,5 g cada) de cada linhagem e cultivar foram usadas para determinar o conteúdo de capsaicinóides (capsaicina, nordihidrocapsaicina e di-hidrocapsaicina). As análises foram realizadas por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC; Shimadzu, modelo SPD-20A) utilizando o método AOAC Official Method 995.03 (Grypa, 2011), com adaptações, para determinação entre 750 e 650.000 SHU.

2.3.6 Análise de carotenóides

As análises de conteúdo de carotenoides foram realizadas para os cultivos em campo aberto, primeiro ciclo (AMB 1) e ambiente protegido (AMB 2). Amostras de 5 g de frutos maduros frescos de cada linhagem e cultivar foram utilizadas para determinar o total de carotenoides. O procedimento de

extração e determinação foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Rodriguez-Amaya (2001). Os valores de carotenoides totais foram obtidos pela leitura de absorbância em espectrofotômetro (Micronal®, B442) usando a fórmula descrita por Bianchini & Penteado (2006).

2.3.7 Análises estatísticas

A homogeneidade e normalidade dos erros do modelo matemático foram testadas, via testes de Bartlett (1937) e Jarque & Bera (1987), respectivamente. A análise de variância conjunta foi realizada para os caracteres morfoagronômicos e físico-bioquímicos, a fim de estimar os principais efeitos das linhagens e ambientes e suas interações (Gomez and Gomez, 1984). O método de Scott-Knott foi utilizado para comparar as diferenças entre as médias ($p < 0,05$). Utilizou-se o programa estatístico Genes (Cruz, 2013).

3. Resultados

3.1 Caracterização morfoagronômica

Os resultados da análise de variância conjunta para os caracteres morfoagronômicos são apresentados na Tabela 2. Influência predominantemente genotípica (>50% da variação total) foi observada para as características de fruto e também para a altura da primeira bifurcação, enquanto que as demais características morfológicas relacionadas à arquitetura de planta foram predominantemente influenciadas pelo ambiente. A interação genótipo x ambiente apenas não foi significativa para largura de fruto.

Tabela 2. Análise de variância conjunta para os caracteres morfoagronômicos altura de planta (AP), largura de planta (LP), altura da primeira bifurcação (APB), número de frutos por planta (NFP), produtividade (PROD), comprimento de fruto (CF), largura de fruto (LF), espessura do pericarpo (EP) e número de lóculos (NL) de três linhagens e duas cultivares de pimenta Habanero avaliadas em três ambientes no período de 2018 a 2019. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Fontes de variância	AP	LP	APB	NFP	Prod.	CF	LF	EP	NL
Genótipos (G)	10.861,4 (28,2)**	2.621,5 (20,9)**	1.200,2 (53,24)**	0,08 (0,64) ^{ns}	2,5x10 ⁸ (4,1) ^{ns}	3.508,9 (87,2)**	433,9 (57,6)**	1,94 (47,2)**	2,5 (58,0)**
Ambiente (A)	24.732,1 (64,0)**	6.803,1 (54,4)**	914,5 (40,6)**	10,8 (87,1)**	2,6 x10 ⁹ (41,1)**	169,8 (4,2)*	161,3 (21,4)**	0,53 (12,8)**	0,008 (0,21) ^{ns}
Erro	135,5 (0,35)	360,1 (2,9)	15,2 (0,67)	0,13 (1,1)	3,4x10 ⁸ (5,3)	64,3 (1,6)	23,0 (3,1)	0,18 (4,4)	0,08 (1,7)
Interação GxA	2.283,4 (5,9)**	2.138,9 (17,1)**	63,5 (2,8)*	1,08 (8,7)**	2,5x10 ⁹ (39,8)**	142,6 (3,5)*	27,9 (3,7) ^{ns}	0,94 (22,9)**	0,74 (18,1)*
Erro (E x Rep x G)	618,5 (1,6)	583,6 (4,7)	60,3 (2,7)	0,33 (2,7)	6,1x10 ⁸ (9,7)	137,4 (3,4)	107,3 (14,2)	0,52 (16,7)	0,92 (21,9)
Média	74,3	88,3	21,4	2,2	24,5	54,1	37,2	1,9	3,2
CV (%)	6,8	5,6	7,4	5,2	20,7	4,4	5,7	8,6	6,0

Os números entre parênteses são porcentagem da soma dos quadrados da variação total.

**Significativo ao nível de probabilidade $P \leq 0,01$; * Significativo ao nível de probabilidade $P \leq 0,05$ e ^{ns}Não significativo pelo teste F, respectivamente.

Valores de altura e largura de planta, altura da primeira bifurcação e espessura do pericarpo do fruto foram superiores em ambiente protegido, com exceção de largura de planta para a linhagem CNPH 15.740, e para a espessura do pericarpo na BRS Nandaia (AMB 2, Tabelas 3 e 4).

‘CNPH 15.740’, cujos frutos são vermelhos quando maduros (Figura 1.A), apresentou adaptação ao cultivo em campo aberto (AMB 1 e AMB 3), apresentando os maiores valores de largura de planta e comprimento de frutos, respectivamente (Tabelas 3 e 4). Resultado semelhante foi observado para número de frutos por planta e produtividade, sendo que as maiores médias foram obtidas no AMB 3, não diferindo significativamente da linhagem CNPH 15.749 e da cultivar BRS Nandaia (Tabela 3).

A linhagem CNPH 15.744, cujos frutos são de coloração amarela quando maduros (Figura 1.B), mostrou-se altamente adaptada ao cultivo em ambiente protegido (AMB 2), apresentando os maiores valores de altura e largura de planta, altura da primeira bifurcação, número de frutos por planta, produtividade e largura de frutos neste ambiente (Tabelas 3 e 4).

‘CNPH 15.749’, cujos frutos são vermelhos quando maduros (Figura 1.C), mostrou-se altamente produtiva no ambiente de cultivo em campo aberto, no período de outubro de 2018 a fevereiro de 2019 (AMB 3) (Tabela 3).

Foi detectada apenas a incidência de *Potato virus Y* (PVY) em campo (Tabela 5). As plantas da linhagem CNPH 15.740 não apresentaram infecção, o que indica uma possível resistência genética ao vírus.

A incidência de *Potato virus Y* (PVY) no cultivo em campo aberto foi observada (Tabela 5), mas não de TSWV, GRSV, PepYMV e PMMoV. Plantas de CNPH 15.740 não apresentaram infecção, indicando uma possível resistência genética ao PVY. Estudos com inoculação artificial foram realizados para avaliar essa resistência potencial e foram apresentados no capítulo 3.

Tabela 3. Valores médios de altura de planta (cm), largura de planta (cm), altura da primeira bifurcação (cm), número de frutos/planta e produtividade (t ha⁻¹) de três linhagens e duas cultivares de pimenta Habanero avaliados em três ambientes de cultivo. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	Altura de planta				Largura de planta				Altura primeira bifurcação				Nº fruto/planta			Produtividade		
	AMB 1 [*]	AMB 2	AMB 3	Média	AMB 1	AMB 2	AMB 3	Média	AMB 1	AMB 2	AMB 3	Média	AMB 1	AMB 2	AMB 3	AMB 1	AMB 2	AMB 3
CNPH 15.740	48,6Cc ¹	80,4Ae	54,4Bc	61,1b	85,7Ca	96,3Bc	102,0Aa	94,6a	17,8Bc	22,5Ac	14,4Cc	18,2b	84,6Ba	85,5Bc	145,3Aa	19,7Ba	17,6Bd	40,3Aa
CNPH 15.744	70,5Ca	143,8Aa	95,9Ba	103,4a	57,1Cc	106,4Aa	78,1Bd	80,5b	30,8Ba	40,0Aa	24,2Ca	31,6a	61,0Bb	179,8Aa	45,6Cb	13,0Bb	35,8Aa	13,7Bc
CNPH 15.749	50,9Cc	91,3Ad	54,5Bc	65,5b	82,1Bb	100,5Ab	99,9Ab	94,1a	20,3Bb	24,4Ab	14,0Cc	19,5b	62,4Cb	107,4Bb	125,2Aa	16,0Cb	27,2Bb	40,2Aa
BRS Juruti	53,8Cb	117,9Ab	60,6Bb	77,4b	81,8Cb	103,2Aa	99,1Bb	94,7a	17,4Bc	23,5Ac	13,0Cc	17,9b	96,2Ba	55,9Cd	127,0Aa	20,2Ba	15,5Ce	33,1Ab
BRS Nandaia	45,2Bc	102,4Ac	45,3Bd	64,3b	50,3Cd	94,5Ac	88,0Bc	77,6b	17,8Bc	25,7Ab	15,5Cb	19,6b	46,1Cb	127,3Bb	162,7Aa	7,2Cc	25,0Bc	42,2Aa
Média	53,8C	107,1A	62,1B	74,3	71,3C	100,1A	93,4B	88,32	20,8B	27,2A	16,2C	21,42	70,1C	111,2B	121,2A	15,2C	24,2B	33,9A
CV (%)	7,65	6,28	6,22	-	7,35	4,24	5,59	-	9,56	5,92	6,06	-	13,74	25,72	23,56	23,64	25,39	15,14

*AMB 1- cultivo no período de janeiro a julho de 2018 em campo aberto; AMB 2 - cultivo no período de janeiro a julho de 2018 em ambiente protegido; AMB 3 - cultivo no período de outubro de 2018 a fevereiro de 2019 em campo aberto.

¹Média seguida pela mesma letra maiúscula na linha não diferencia significativamente os ambientes ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott; Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 4. Valores médios de comprimento de fruto (mm), largura de fruto (mm), espessura do pericarpo (mm) e número de lóculos de três linhagens e duas cultivares de pimenta Habanero avaliados em três ambientes de cultivo. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	Comprimento de fruto				Largura de fruto				Espessura do pericarpo				Número de lóculos
	AMB 1 [*]	AMB 2	AMB 3	Média	AMB 1	AMB 2	AMB 3	Média	AMB 1	AMB 2	AMB 3	Média	
CNPH 15.740	66,7Aa ¹	64,4Ba	68,6Aa	66,5a	33,1	33,1	37,5	34,5b	1,8Bb	2,1Ab	1,9Bc	1,9b	2,8c
CNPH 15.744	41,4Be	40,0Bd	47,5Ad	42,9d	40,2	41,2	43,2	41,5a	1,8Bb	2,0Ab	1,3Cd	1,7b	3,2c
CNPH 15.749	62,6Ab	58,9Bb	64,3Ab	61,9b	34,6	34,1	40,7	36,5b	1,9Bb	2,2Ab	2,0Ab	2,0b	3,2b
BRS Juruti	56,3Ac	47,6Cc	49,9Bc	51,2c	40,1	37,5	42,3	39,9a	1,8Bb	2,0Ab	1,9Bc	1,9b	3,6a
BRS Nandaia	49,7Ad	45,8Bc	47,5Bd	47,6c	32,4	32,3	35,6	33,4b	2,1Ca	2,3Ba	2,6Aa	2,3a	3,3b
Média	55,3A	51,3B	55,5A	54,1	36,0B	35,6B	39,8A	37,2	1,8B	2,1A	1,9 B	1,9	3,2
CV (%)	4,88	4,66	3,65	-	6,06	5,85	5,18	-	3,67	7,48	9,62	-	-

*AMB 1- cultivo no período de janeiro a julho de 2018 em campo aberto; AMB 2 - cultivo no período de janeiro a julho de 2018 em ambiente protegido; AMB 3 - cultivo no período de outubro de 2018 a fevereiro de 2019 em campo aberto.

¹Média seguida pela mesma letra maiúscula na linha não diferencia significativamente os ambientes ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott; Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 5. Avaliação sorológica (Dot-Elisa) para identificação da ocorrência natural de vírus em linhagens avançadas e cultivares de pimenta Habanero. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	Nº de plantas avaliadas	Ocorrência de PVY	Incidência, %
CNPH 15.740	18	0	0
CNPH 15.744	18	16	89
CNPH 15.749	18	4	22
BRS Nandaia	18	11	61
BRS Juruti	18	0	0

3.2 Caracterização físico-química

O ambiente exerceu influência (superior a 40%) nos valores de SST e pH. Elevada variação devido ao genótipo foi observada para as características luminosidade, cromaticidade, ângulo hue, vitamina C, capsaicinóides e carotenóides totais. Houve interação genótipo x ambiente para as características sólidos solúveis totais, pH, cromaticidade, vitamina C e carotenóides totais (Tabela 6).

‘CNPH 15.740’, assim como CNPH 15.749 destacaram-se quanto à acidez titulável total e teor total de carotenóides (Tabelas 7 e 8). Entre as linhagens, CNPH 15.740 apresentou o maior conteúdo de capsaicinóides, em todos os ambientes (Tabela 7). Diferentes níveis de capsaicinóides foram observados nas três linhagens avançadas, sendo CNPH 15.744 particularmente interessante devido a proporção de nordiidrocapsaicina em relação à capsaicina ser muito alta, 26,3% e 14,2%, respectivamente, do total de capsaicinóides; diferindo consideravelmente dos outros genótipos.

‘CNPH 15.744’ e a cultivar BRS Nandaia foram superiores para pH na condição de cultivo em campo aberto AMB 1 (Tabela 8). Valor inferior de acidez titulável e capsaicina também foi observado para a linhagem. ‘CNPH 15.744’ apresentou os maiores valores de luminosidade, cromaticidade e °hue, em todos os ambientes (Tabela 7). Vale ressaltar que esta linhagem possui a coloração amarela, que difere das demais linhagens e de ‘BRS Juruti’, que apresentam cor vermelha, além de ‘BRS Nandaia’, que possui cor alaranjada.

O AMB 1 foi, no geral, o ambiente mais favorável para a expressão de teores de SST e de cromaticidade superiores. Já, para expressão de pH e teores de vitamina C superiores, o AMB 3 foi mais favorável. Ambos os ambientes (AMB 1 e AMB 3) representam o cultivo em campo em diferentes períodos.

Tabela 6. Análise de variância conjunta para os caracteres físico-bioquímicos de frutos: sólidos solúveis totais (SST), pH, acidez total titulável (ATT), luminosidade (LUZ), cromaticidade (CROMA), ângulo hue (°hue) e vitamina C de três linhagens e duas cultivares de pimenta Habanero, avaliados em três ambientes, no período de 2018 a 2019. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Fontes de variância	SST	pH	ATT	Luz	Cromaticidade	°hue	Vit. C
Genótipos (G)	3,5 (13,8) **	0,80 (12,1) **	0,028 (26,1) *	4939,5 (96,0) **	3546,2 (89,5) **	14108,4 (99,1) **	36990,3 (40,1) **
Ambiente (A)	10,5 (40,2) **	5,9 (79,8) **	0,019 (17,12) *	51,6 (1,0) ns	245,8 (6,2) **	1,7 (0,01) ns	21801,1 (23,64) **
Erro	2,1 (8,4)	0,05 (0,7)	0,012 (11,7)	56,2 (1,1)	46,2 (1,2)	31,8 (0,2)	7007,7 (7,6)
Interação GxA	4,9 (18,8) *	0,38 (5,2) **	0,009 (8,1) ns	23,0 (0,4) ns	59,4 (1,5) *	26,7 (0,2) ns	5450,2 (5,9) **
Erro (E x Rep x G)	4,9 (18,8)	0,16 (2,2)	0,041 (36,9)	73,9 (1,4)	64,8 (1,6)	64,6 (0,5)	20990,7 (22,8)
Média	7,82	5,16	0,24	49,20	56,62	50,97	177,01
CV (%)	5,82	2,26	16,97	3,56	2,90	3,21	16,70

Os números entre parênteses são porcentagem da soma dos quadrados da variação total.

**Significativo ao nível de probabilidade $P \leq 0,01$; * Significativo ao nível de probabilidade $P \leq 0,05$ e ns Não significativo pelo teste F, respectivamente.

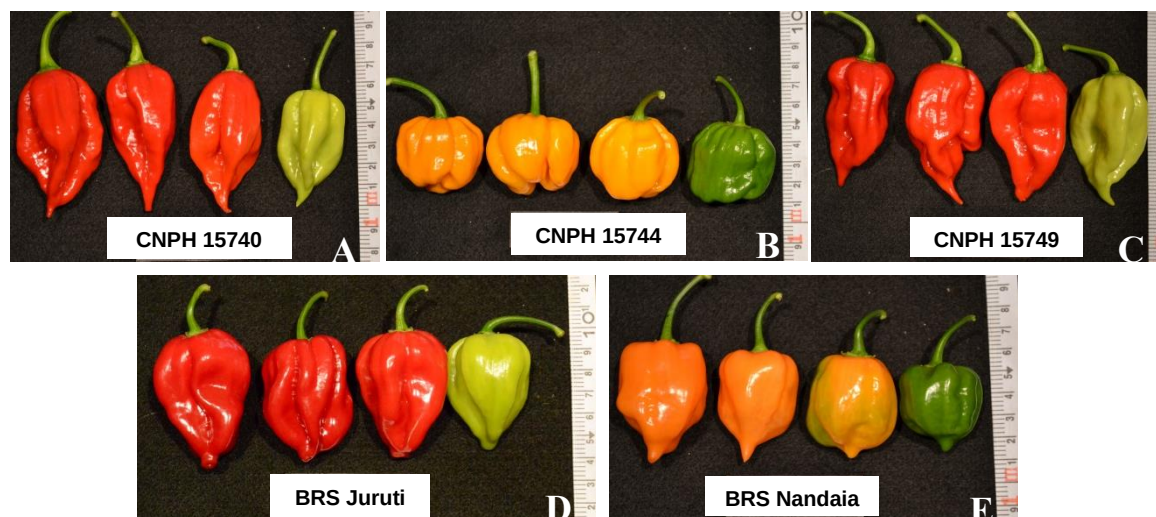


Figure 1. Frutos das linhagens avançadas: A. CNPH 15.740; B. CNPH 15.744; C. CNPH 15.749; e cultivares: D. BRS Juruti e E. BRS Nandaia. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Tabela 7. Valores médios de luminosidade (Luz), cromaticidade (croma), ângulo hue ($^{\circ}$ hue), vitamina C ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$), teor de capsaicinóides (SHU) e carotenóides totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco) de três linhagens e duas cultivares de pimenta Habanero avaliados em três ambientes de cultivo. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	Luz	Croma				$^{\circ}$ hue	Vitamina C				Capsaicinóides	Carotenóides totais		
		AMB 1*	AMB 2	AMB 3	Média		AMB 1	AMB 2	AMB 3	Média		AMB 1	AMB 2	Média
CNPH 15.740	41,3c	56,8Ac ¹	51,7Bb	51,6Bb	53,3b	36,7c	146,0Bd	131,6Bc	169,1Ac	148,9 b	147.773,9b	270,6Aa	170,7Ba	220,6a
CNPH 15.744	65,7a	78,0Aa	70,5Ca	73,3Ba	73,9a	78,3a	175,7Bc	166,8Bb	189,9Ab	177,4 b	4.565,4d	131,2Ab	104,1Bb	117,6c
CNPH 15.749	40,8c	54,2Ad	51,5Bb	51,6Bb	52,4b	36,9c	168,6Bc	115,8Cc	197,3Ab	160,5 b	90.937,8c	260,6Aa	196,0Ba	228,3a
BRS Juruti	40,6c	50,2Ae	47,3Bc	48,8Bc	48,7c	37,1c	191,3Ab	128,4Cc	180,8Ac	166,8 b	200.088,8a	143,7Bb	189,2Aa	166,4b
BRS Nandaia	57,6b	60,1Ab	51,3Bb	52,4Bb	54,6b	65,9b	237,5Aa	193,9Ba	262,4Aa	231,2 a	225.389,4a	17,1Ac	14,7Ac	15,9d
Média	49,2	59,8A	54,4B	55,5B	56,6	50,9	183,82 B	147,3 C	199,9A	177,0	133.751,1	164,7A	135,0 B	149,82
CV (%)	4,33	2,80	2,43	3,36	5,45	8,28	16,17	17,65	16,37	6,74	28,71	21,36	25,12	12,56

*AMB 1- cultivo no período de janeiro a julho de 2018 em campo aberto; AMB 2 - cultivo no período de janeiro a julho de 2018 em ambiente protegido; AMB 3 - cultivo no período de outubro de 2018 a fevereiro de 2019 em campo aberto.

¹Média seguida pela mesma letra maiúscula na linha não diferencia significativamente os ambientes ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott; Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 8. Valores médios de sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix), pH e acidez titulável total (ATT -%) de três linhagens e duas cultivares de pimenta Habanero, avaliadas em três ambientes de cultivo. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	Sólidos solúveis totais				pH				ATT
	AMB 1*	AMB 2	AMB 3	Média	AMB 1*	AMB 2	AMB 3	Média	
CNPH 15.740	9,0Ab ¹	7,2Bb	7,4Bb	7,8b	4,9Bc	4,8Ba	5,4Ac	5,0b	0,27a
CNPH 15.744	8,2Ac	7,4Bb	7,5Bb	7,7b	5,2Ba	4,9Ca	5,8Ab	5,3a	0,22b
CNPH 15.749	8,1Ac	7,3Bb	7,0Bb	7,0 b	4,9Bc	4,7Cb	5,3Ac	4,9b	0,28a
BRS Juruti	7,8Ac	8,1Aa	7,3Bb	7,7b	5,0Bb	4,7Cb	5,8Ab	5,1b	0,24b
BRS Nandaia	9,4Aa	7,5Cb	8,0Ba	8,3a	5,1Ba	4,9Ca	5,9Aa	5,3a	0,21b
Média	8,5A	7,5B	7,4B	7,8	5,0B	4,8B	5,6A	5,1	0,24
CV (%)	5,6	6,1	5,6	6,3	0,76	1,1	2,2	2,4	1,1

*AMB 1- cultivo no período de janeiro a julho de 2018 em campo aberto; AMB 2 - cultivo no período de janeiro a julho de 2018 em ambiente protegido; AMB 3 - cultivo no período de outubro de 2018 a fevereiro de 2019 em campo aberto.

¹Média seguida pela mesma letra maiúscula na linha não diferencia significativamente os ambientes ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott; Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna não diferencia significativamente os genótipos ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

4. Discussão

4.1 Caracterização morfoagronômica

O Brasil é um importante centro de diversidade do gênero *Capsicum* e a bacia Amazônica é considerada o centro de domesticação da espécie *C. chinense* (Baba et al., 2015). O Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Hortaliças (BAG) mantém 542 acessos identificados como *C. chinense* provenientes das diferentes regiões brasileiras e, em especial, da região da bacia Amazônica (Nass et al., 2015), representando, assim, parte considerável da variabilidade existente na espécie. Dentre os acessos de *C. chinense* preservados no BAG, 31 acessos do tipo morfológico Habanero foram utilizados para o desenvolvimento da população base (Nass et al., 2015) que deu origem às linhagens que foram objeto do presente estudo. Assim, deve-se enfatizar que o desenvolvimento destas linhagens se beneficiou da exploração de uma população com uma base genética extremamente ampla, representativa da variabilidade dentro do tipo morfológico Habanero.

A variação observada nos diferentes ambientes teve efeito significativo na altura e largura da planta, altura da primeira bifurcação, número de frutos por planta e produtividade. A variação causada pelo ambiente é altamente significativa quando comparada às outras fontes de variação consideradas na análise (genótipo, interação genótipo x ambiente e erro). Jeeatid et al. (2018) também observaram efeitos semelhantes na produtividade de frutos secos e no conteúdo de capsaicina. Variação significativa causada pelo ambiente indica que os efeitos ambientais influenciam a expressão desses caracteres, podendo ser explicado pela sua herança poligênica. De acordo com Stommel & Griesbach (2008), características relacionadas à arquitetura, como altura e largura de planta, possuem herança quantitativa com múltiplos genes atuando na expressão e com efeito de epistasia. Todorov (1992) observou que nos cruzamentos entre seleções de pimenta de porte anão e indeterminado, a altura da planta foi influenciada por pelo menos dois a três genes, com efeitos ambientais tendo uma influência mais forte do que os fatores genéticos. Efeito semelhante foi relatado para os caracteres número de frutos e produtividade (Santos et al., 2014).

Entre os diversos elementos ambientais, a temperatura, a luminosidade, a umidade relativa do ar, a altitude e a nutrição da planta possuem forte influência no desenvolvimento vegetativo de pimentas (De Swart et al., 2006). De acordo com Fan et al. (2013), a luz é um dos fatores ambientais mais importantes para o crescimento da planta; a intensidade e a qualidade luminosa são essenciais para o desenvolvimento, morfogênese e outras respostas fisiológicas. Macedo et al. (2011) ressaltam que mudanças no espectro da luz influenciam fortemente características anatômicas, fisiológicas e morfológicas das folhas, podendo ocasionar variações na taxa fotossintética.

Os elevados valores de altura de planta, largura de planta e altura da primeira bifurcação verificados em cultivo protegido, podem ser explicados pela redução da intensidade luminosa, ocasionada pelo filme plástico da cobertura do telado e pela temperatura mais alta durante o desenvolvimento da planta, verificados nos valores climáticos durante a condução dos experimentos (Tabela 1). Reis et al. (2012) relatam que a composição do material de cobertura, bem como a deposição de poeira, envelhecimento do material plástico e condensação da umidade atmosférica afetam significativamente a densidade de fluxo de radiação no interior do ambiente protegido. Níveis reduzidos de radiação podem provocar adaptações na planta que maximizam a captação da luz disponível, atendendo à demanda de fotossíntese, como o aumento na área foliar específica e altura da planta (Fan et al., 2013). O aumento na temperatura do ar, provocado pela refração da luz solar sobre o filme de cobertura, transforma as ondas curtas em ondas longas, retendo-as no interior da estufa e alterando o balanço de energia em relação ao ambiente externo (Reis et al., 2012). Gurung et al. (2011) destacam que a temperatura elevada durante o desenvolvimento aumenta a taxa de crescimento das plantas, brotação e alongamento dos entrenós.

Diferentemente dos caracteres relacionados à morfologia de planta, as características de frutos mostraram-se pouco influenciadas pelo fator ambiental. De acordo com Gurung et al. (2011), a baixa influência ambiental para caracteres de frutos pode indicar que genes de efeito maior atuam no controle da expressão. Chunthawodtiporn et al. (2018) relataram a ação de três

genes na expressão do tamanho e formato de fruto de pimenta: *Big Brother*, *Ovate* e *KLUH/CYP78A5*.

O estudo da morfologia e das características de interesse agrônomo de planta e fruto é importante principalmente quando se deseja indicar uma cultivar promissora que atenda às necessidades do produtor, da indústria e do consumidor final, além de ser fonte de informação para registro e proteção de cultivares. Heinrich et al. (2015) relataram que o conhecimento de características de fruto é de grande relevância para o cultivo de pimentas, visto que a escolha do material a ser cultivado depende da aceitação e da demanda de mercado para tais caracteres. Ulhoa et al. (2017) citaram a espessura do pericarpo do fruto como sendo particularmente importante para o rendimento de polpa usada na fabricação de molhos. Ferraz et al. (2016) aponta que certas características morfológicas, como maior comprimento e largura do fruto, são de grande importância devido à sua alta correlação com outros caracteres de interesse, como a produtividade.

As características de planta observadas na linhagem CNPH 15.744 como hábito de crescimento ereto, porte alto e altura de primeira bifurcação acima de 30 cm são desejáveis, principalmente pela facilidade no processo de colheita, seja manual ou mecanizado (Gomes et al., 2019). No entanto, é necessário ter cautela ao indicar esse genótipo quando o cultivo é realizado em regiões com alto índice de vento, devido à possibilidade de acamamento da planta. Quando cultivado em ambiente protegido, este fator é minimizado. Para características número de frutos por planta e produtividade, a linhagem mostrou-se promissora para a região do Distrito Federal em cultivo em telado. Devido a esse desempenho, CNPH 15.744 pode ser indicada para cultivo em ambiente protegido.

Em contraste, as linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.749, por apresentarem hábito de crescimento intermediário, porte médio, altura da primeira bifurcação (APB) entre 17,8 e 24,4 cm e maiores médias de comprimento de fruto, número de frutos por planta e produtividade, são mais indicadas para cultivo em campo aberto.

A ausência de plantas da linhagem CNPH 15.740 infectadas por PVY pode ser atribuída a uma possível resistência genética. Na literatura, é possível encontrar diversos registros de *Capsicum* resistentes a PVY (Boiteux et al., 1996; Echer et al., 2002; Moodley et al., 2019). A ausência de infecção por TSWV, GRSV, PepYMV e PMMoV em todas as linhagens e cultivares pode estar relacionada a outros fatores, como a baixa ocorrência de vetores de transmissão, devido às condições climáticas durante a condução do experimento, ou à inexistência dos patógenos na área de cultivo. Ssemwogerere et al. (2013) relatam que em períodos de alta pluviosidade, a população de trips, agente de transmissão de TSWV e GRSV, tende a diminuir, reduzindo assim a ocorrência dessas espécies na área de cultivo. Efeito similar foi observado por Aheer et al. (2008) para pulgão, vetor de PepYMV. Como a transmissão de PMMoV ocorre, em geral, através de sementes infectadas e contato mecânico (Lima et al., 2011), possivelmente não houve a ocorrência desses fatores no presente trabalho, devido à ausência de plantas com o vírus. Para a confirmação da possível resistência das linhagens às espécies de vírus, fez-se necessária a realização de estudos, da reação da planta à inoculação mecânica (artificial) com as espécies de vírus.

4.2 Caracterização físico-química

A determinação do teor de sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável total em frutos de pimentas mostra-se importante, principalmente, como fonte de informação para a indústria de processamento. Elevados teores de sólidos solúveis totais implicam em maior rendimento e menor custo operacional, resultando em maior economia no processamento (Faria et al., 2013). Borges et al. (2015) afirmam que frutos mais ácidos são considerados mais estáveis quanto à deterioração por microrganismos do que aqueles que apresentam pH próximo à neutralidade. A acidez titulável é essencial para a apreciação do estado de conservação, refletindo nos processos de decomposição do alimento, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação (Borges et al., 2015). Sendo assim, quanto menor o teor de acidez titulável no fruto, melhor seu estado de conservação (Reis et al., 2015). Neste sentido, a linhagem CNPH 15.744 destacou-se por apresentar valores consideráveis de sólidos solúveis

totais e pH, e média inferior de acidez titulável. Sosa-Moguel et al. (2017), ao avaliarem duas cultivares de pimenta Habanero obtiveram valores inferiores de SST, com médias de 4,7 e 4,9 °Brix. Borges et al. (2015) observaram teores de SST que variaram de 4,3 a 11 °Brix ao avaliarem acessos de *C. chinense*. Resultados de pH encontrados no presente estudo foram semelhantes aos observados por Pino et al. (2007), que avaliaram 10 cultivares de pimenta Habanero e obtiveram valores que variaram de 4,9 a 5,4.

A linhagem CNPH 15.744 também se destacou quanto ao conteúdo de vitamina C quando cultivada em ambiente protegido. Os valores observados na linhagem sobressaíram-se aos observados por Nass et al. (2015) nos 31 acessos genitores da população base, com médias de ácido ascórbico que variaram entre 54 e 130 mg/100g. Teodoro et al. (2013), ao analisarem 22 acessos de pimenta Habanero do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças, verificaram concentrações de vitamina C que variaram de 54,1 a 129,8 mg/100g.

Aproximadamente 80-90% do conteúdo total de capsaicinóides em frutos de pimentas é representado pela capsaicina e dihidrocapsaicina; a parte restante é representada por nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina e homocapsaicina (Laskari-dou-Mon-nerville, 1999; Sganz-erla et al., 2014). No entanto, Zewdie e Bosland (2001) relataram que a generalização de que capsaicina e dihidrocapsaicina são sempre os principais capsaicinóides não é verdadeira, exceções têm sido encontradas. A proporção de capsaicina / dihidrocapsaicina pode ser de 1: 1 ou 2: 1 (Hayman e Kam, 2008). Zewdie e Bosland (2001) relataram que a proporção de capsaicina, dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina em pimenta Habanero pode chegar a 78%, 46% e 10%, respectivamente. A pungência média das linhagens avançadas objeto deste estudo, variaram de 4565,44 SHU para CNPH 15.744 a 147.773,94 SHU para CNPH 15.740 (Tabela 7). CNPH 15.744 é levemente picante e altamente aromática, além de apresentar frutos amarelos, o que a torna uma forte candidata ao consumo de mesa. Surpreendentemente, CNPH 15.744 apresentou níveis muito altos de nordihidrocapsaicina (14,2%), cerca de 40% superior ao nível mais alto relatado por Zewdie e Bosland (2001). O padrão

químico de capsaicina produzido pela Sigma ©, de acordo com Lee et al. (1976), consiste em 71% de capsaicina, 26% de dihidrocapsaicina e 3% de nordihidrocapsaicina. Altos valores de nordihidrocapsaicina são encontrados em *C. annuum* (Lee et al, 1976). Relata-se que *C. pubescens* possui até 24% de nordihidrocapsaicina (Zewdie e Bosland, 2001). Deve-se notar que os perfis de capsaicinóide não são bons indicadores quimiotaxonômicos para espécies de *Capsicum*, mas são muito importantes para o consumidor, incluindo a indústria, devido às propriedades sensoriais da pungência da pimenta e sua importância para a qualidade dos alimentos e a preferência cultural (Guzmán e Bosland, 2017). A nordihidrocapsaicina é considerada a menos irritante dos capsaicinóides, e a sensação de ardor fica localizada na região frontal da língua, causando um “efeito de aquecimento suave” (Krajewska e Powers, 1988). As características sensoriais de CNPH 15.744 sugerem que esta linhagem avançada tem um grande potencial para ocupar um novo nicho de pimentas Habanero.

CNPH 15.740 apresenta valor de SHU mais alto do que as pimentas do grupo malagueta (*C. frutescens*), considerada a mais apreciada no Brasil, tendo valores de SHU geralmente na faixa de 100.000 a 120.000 SHU (Ribeiro et al., 2008). CNPH 15.740 é uma forte candidata à produção de pasta de pimenta com elevada pungência, usada principalmente para a fabricação de molhos.

Carotenóides totais apresentaram-se em concentrações relativamente baixas, conforme o esperado, nos genótipos de frutos amarelos e alaranjados (CNPH 15.744 e ‘BRS Nandaia’, respectivamente). As concentrações de carotenóides totais em pimentas do grupo Habanero têm variado de 13 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco em frutos alaranjados a 446 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco em frutos vermelhos (Wall et al., 2001). Valores médios a altos de teores de carotenóides foram observados para CNPH 15.740 e CNPH 15.749 (Tabela 7). Essas duas linhagens avançadas podem ser consideradas boas fontes de antioxidantes, e fontes promissoras de ingredientes naturais para o desenvolvimento de alimentos funcionais (Campos et al., 2013).

A variação das características bioquímicas nos sistemas de cultivo pode estar relacionada à ação dos fatores ambientais que interferem diretamente nas atividades metabólicas durante o desenvolvimento da planta, podendo influenciar na concentração de componentes fitoquímicos nos frutos. Luminosidade, temperatura, condição nutricional e grau de maturação do fruto são fatores que interferem diretamente na concentração de componentes bioquímicos nos frutos (Kaleem et al., 2016). Ilíc et al. (2015) afirmam que baixa luminosidade diminui o conteúdo de sólidos solúveis, ácido ascórbico e pigmentos (carotenóides) em frutos de tomateiro. Njoku et al. (2011) relatam que a temperatura afeta significativamente o nível de vitamina C em frutos de citros; áreas com temperatura amena produzem frutos com elevado teor de ácido ascórbico. De fato, os frutos de pimenta produzidos em condição de campo, onde a temperatura diurna foi inferior à do cultivo protegido (Tabela 1), apresentaram as maiores concentrações de vitamina C. Agostini-Costa et al. (2017) trabalhando com pimentas do tipo jalapeño (*C. annuum*) também observaram teores de vitamina C superiores em frutos de plantas cultivadas em campo.

Os resultados obtidos no presente estudo são uma importante fonte de informação para o processo de registro de cultivares, exigido pelo Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento brasileiro (RNC/MAPA), assim como para a cadeia produtiva de pimentas *Capsicum*. O registro de cultivares, segundo o sistema brasileiro, tem como princípio o estabelecimento de mecanismos para cadastrar e organizar informações detalhadas sobre as características das novas cultivares, habilitando-as para a produção e comercialização, em todo o território nacional (Gomes et al., 2016). A inscrição destas três novas linhagens, futuras cultivares no Registro Nacional de Cultivares (RNC/MAPA), será realizada mediante a apresentação de formulários técnicos contendo informações sobre características agronômicas, bem como suas propriedades de uso em atividades agrícolas, industriais, comerciais e de consumo *in natura* (Carvalho et al., 2009) geradas no presente trabalho.

O desenvolvimento de novas cultivares de pimenta Habanero adaptadas às condições brasileiras de cultivo e com características morfoagronômicas e bioquímicas de interesse do agronegócio é estratégico em um momento de demanda crescente, tanto nacional como internacional, por este tipo de pimenta e tendo em vista a carência de cultivares disponíveis no mercado nacional. Atualmente, apenas as cultivares brasileiras BRS Nandaia e BRS Juruti estão registradas no RNC/MAPA, apesar de existirem outras cultivares importadas disponíveis para comercialização.

4. Conclusão

As três novas linhagens caracterizadas no presente estudo apresentaram características importantes e desejáveis como produtividade e qualidade de frutos superiores em ambiente protegido (CNPH 15.744), potencial de cultivo em campo aberto com menor incidência de PVY (CNPH 15.740) e aptidão produtiva para campo aberto (CNPH 15.749). CNPH 15.744 apresentou qualidades sensoriais únicas para pimenta Habanero. Com isso, as linhagens CNPH 15.740, CNPH 15.744 e CNPH 15.749 apresentam potencial para serem registradas junto ao RNC/MAPA e lançadas como novas cultivares de pimenta Habanero desenvolvidas no (e para) o Brasil, aumentando as opções para a cadeia produtiva de pimentas e para os consumidores intermediários e finais.

Referências

- Agostini-Costa, T.S., Gomes, I.S., Melo, L.M.P., Reifschneider, F.J.B., Ribeiro, C.S.C. 2017. Carotenoid and total vitamin C content of peppers from selected Brazilian cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*. 57, 73–79.
- Aheer, G.M., Ali, A., Munir, M. 2008. Abiotic factors effect on population fluctuation of alate aphids in wheat. *Journal of Agricultural Research*. 46, 367–371.
- Alliprandini, L.F., Vello, N.A. 2004. Heritability and correlations among traits in four-way soybean crosses. *Euphytica* 136, 81-91.

AOAC. 2006. Spices and other condiments. Official Methods of Analysis. Chapter. 43, 14-15.

Baba, V.Y., Rocha, K.R., Gomes, G.P., Ruas, C.D., Ruas, P.M., Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A. 2016. Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. Genet Resour Crop Evol. 63, 1371–1381.

Boiteux, L.S.; Cupertino, F.P.; Silva, C.; Dusi, A.N.; Monte-Neshich, D.C. 1996. Resistance to *Potato virus Y* (pathotype 1-2) in *Capsicum annuum* and *Capsicum chinense* is controlled by two independent major genes. Euphytica 87, 53-58.

Borges, K.M., Vilarinho, L.B.O., Filho, A.A.M., Morais, B.S., Rodrigues, R.N.S. 2015. Morpho-agronomic and physicochemical characterisation of the pepper for the State of Roraima. Revista Agro@mbiente 9, 292-299.

Butcher, J.D., Crosby, K.M., Yoo, K.S., Patil, B.S., Ibrahim, A.M.H., Leskovar, D.I., Jifon, J. L. 2012. Environmental and genotypic variation of capsaicinoid and flavonoid concentrations in Habanero (*Capsicum chinense*) peppers. HortScience 47, 574–579.

Campos, M.R.S., Gómez, K.R., Ordoñez, Y.M., Ancona, D.B. 2013. Polyphenols, ascorbic acid and carotenoids contents and antioxidant properties of Habanero pepper (*Capsicum chinense*) fruit. Food and Nutrition Sciences 4, 47-54.

Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Bello-Bello, J.J., Lecona-Guzmán, C., Solís-Marroquín, D., Avilés-Viñas, S., Gómez-Uc, E., López-Puc, G., Santana-Buzzy, N. 2008. Capsaicinoids content in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): hottest known cultivars. HortScience 43, 1344–1349.

Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B., Reifschneider, F.J.B. 2009. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. Horticultura Brasileira 27, 135-138.

Castro-Concha, L.A., Tuyub-Che, J., Moo-Mukul, A., Vazquez-Flota, F.A., Miranda-Ham, M.L. 2014. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal* 195, 1-5.

Chunthawodtiporn, J., Hill, T., Stoffel, K., Van Deynze, A. 2018. Quantitative trait *loci* controlling fruit size and other horticultural traits in bell pepper (*Capsicum annuum*). *The Plant Genome* 11, 1-11.

Clark, M.F., Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475-83.

Cruz, C.D. 2016. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum. Agronomy* 38, 547-552

De Swart, E.A.M., Marcelis, L.F.M., Voorrips, R.E. 2006. Variation in relative growth rate and growth traits in wild and cultivated *Capsicum* accessions grown under different temperatures. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81, 1029–1037.

Des Marais, D.L., Hernandez, K.M., Juenger, T.E. 2013. Genotype-by-environment interaction and plasticity: exploring genomic responses of plants to the abiotic environment. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 44, 5-29.

Echer, M.M., Costa, C.P. 2002. Reaction of sweet pepper to the *Potato Virus Y* (PVYm). *Scientia Agricola* 59, 309-314.

Faleiro, F.G., Neto, A.L.F., Junior, W.Q.R. 2008. Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Embrapa Cerrados. 184p.

Fan, X., Xu, Z., Liu, X., Tang, C., Wang, L., Han, X. 2013. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Scientia Horticulturae* 153, 50–55.

- Faria, P.N.L., Cardoso, G.A., Finger, K.A., Luis, F., Cecon, P.R. 2013. Estudo da variabilidade genética de amostras de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.) existentes num banco de germoplasma: um caso de estudo. *Revista de Ciências Agrárias* 36, 17-22.
- Ferraz, R.M., Ragassi, C.F., Heinrich, A.G., Lima, M.F., Peixoto, J.R., Reifschneider, F.J.B. 2016. Caracterização morfoagronômica preliminar de acessos de pimentas cumari. *Horticultura Brasileira* 34, 498-506.
- Giuffrida, D., Dugo, P., Torre, G., Bignardi, C., Cavazza, A., Corradini, C., Dugo, G. 2013. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry* 140, 794–802.
- Gomes, L.M., Ribeiro, C.S.C., Ragassi, C.F., Silva, L.S., Reifschneider, F.J.B. 2019. Advanced lines of Jalapeño pepper with potential for mechanical harvesting. *Ciência Rural* 49, 1-6.
- Gomes, G.P., Gonçalves, L.S.A., Sekiya, A., Euzébio, M.P., Robaina, R.R., Marinho, C.D. 2016. Registro e proteção de olerícolas no Brasil, período de 1998 a 2014. *Horticultura Brasileira* 34, 019-026.
- Gómez-García, M.R., Ochoa-Alejo, N. 2013. Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences* 14, 19025-19053.
- Gomez, K.A., Gomez, A.A., 1984. Statistical procedures for agricultural research, 2nd Ed. Wiley, New York.
- Gurung, T., Techawongstien, S., Suriharn, B., Techawongstien, S. 2011. Impact of environments on the accumulation of Capsaicinoids in *Capsicum* spp. *HortScience* 46, 1576–1581.
- Gurung, T., Techawongstien, S., Suriharn, B., Techawongstien, S. 2012. Stability analysis of yield and capsaicinoids content in chili (*Capsicum* spp.) grown across six environments. *Euphytica* 187, 11–18.

Guzmán, I., Bosland, P.W. 2017. Sensory properties of chile pepper heat - and its importance to food quality and cultural preference. *Appetite* 117, 186-190.

Hayman, M., Kam, P.C.A. 2008. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care* 19, 338–343.

Heinrich, A.G., Ferraz, R.M., Ragassi, C.F., Reifschneider, F.J.B. 2015. Caracterização e avaliação de progênies autofecundadas de pimenta biquinho salmão. *Horticultura Brasileira* 33, 465-470.

IAL (Instituto Adolfo Lutz). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: IAL, 2008. 1018p.

Ilic, Z.S., Milenkovic, L., Šunica, L., Fallik, E. 2015. Effect of coloured shade-nets on plant leaf parameters and tomato fruit quality. *J Sci Food Agric* 95, 2660–2667.

IPGRI. 1995. Descriptores para *Capsicum* (*Capsicum* spp.). Roma: IPGRI. 51 p.

Jeeatid, N., Suriharn, B., Techawongstien, S., Chanthai, S., Bosland, P.W., Techawongstien, S. 2018. Evaluation of the effect of genotype-by-environment interaction on capsaicinoid production in hot pepper hybrids (*Capsicum chinense* Jacq.) under controlled environment. *Scientia Horticulturae* 235, 334–339.

Kaleem, A., Nazir, H., Pervaiz, S., Qtedar, M., Abdullah, R., Aftab, M., Naz, S. 2016. Investigation of the effect of temperatute on vitamin c in fresh and packed fruit juices. *Fuuast J. Biol.* 6, 117-120.

Kim, S., Park, M., Yeom, S.I. et al., 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics* 46, 271-278.

Krajewska, A.M., Powers, J.J. 1988. Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. *Journal of Food Science* 53, 902-905.

Lannes, S.D., Finger, F.L., Schuelter, A.R., Casali, V.W.D. 2007. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Scientia Horticulturae* 112, 266–270.

Laskaridou-Monnerville, A. 1999. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin by micellar electrokinetic capillary chromatography and its application to various species of *Capsicum*, Solanaceae. *Journal of Chromatography A* 838, 293–302.

Lee, U., Suzuki, T., Kobaski, M., Hasegawa, K., Iwai, K. 1976. Quantitative microanalysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin using mass fragmentography. *Journal of chromatography* 123, 119-128.

Lima, M.F., Ulhoa, A.B., Inoue-Nagata, A.K., Ferraz, R.M., Souza, K.R.R., Reifschneider, F.J.B. 2011. Virus incidence in domesticated and semi-domesticated field-grown hot peppers (*Capsicum* spp.). *Acta Horticulturae* 917, 285-290.

Macedo, A.F., Leal-Costa, M.V., Tavares, E.S., Lage, C.L.S., Esquibel, M.A. 2011. The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plant of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. *Environ. Exp. Bot.* 70, 43-50.

Mackay, I.J., Bansept-Basler, P., Barber, T., Bentley, A.R., Cockram, J., Gosman, N., Greenland, A.J., Horsnell, R., Howells, R., O'Sullivan, D.M., Rose, G.A., Howell, P.J. 2014. An eight-parent multiparent advanced generation intercross population for winter-sown wheat: creation, properties and validation. *G3* 4: 1603-1610.

Marinho, C.D., Martins, F.J.O., Amaral, S.C.S., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Mello, M.P. 2011. Revisiting the Brazilian scenario of registry and protection of cultivars: an analysis of the period from 1998 to 2010, its dynamics and legal observations. *Genetics and Molecular Research* 10, 792-809.

Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F. 2009. The influence of fruit ripening on

the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. Food Chemistry 114, 553–560.

Njoku, P.C., Ayuk, A.A., Okoye, C.V. 2011. Temperature Effects on Vitamin C Content in Citrus Fruits. Pakistan Journal of Nutrition 10, 1168-1169.

Moodley, V., Naidoo, R., Gubba, A., Mafongoya, P.L. 2019. Development of *Potato virus Y* (PVY) resistant pepper (*Capsicum annuum* L.) lines using marker-assisted selection (MAS). Physiological and Molecular Plant Pathology, 105, 96-101.

Nass, L.L., Souza, K.R.R., Ribeiro, C.S.C., Reifschneider, F.J.B. 2015. Synthesis of a base population of Habanero pepper. Horticultura Brasileira 33, 530-532.

Ornelas-Paz, J.J., Martínez-Burrola, J.M., Saúl Ruiz-Cruz, S., Santana-Rodríguez, V., Ibarra-Junquera, V., Olivas, G.I., David Pérez-Martínez, J. 2010. Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers. Food Chemistry 119, 1619–1625.

Pereira, I.S., Barreto, F.Z., Balsalobre, T.W.A., Sala, F.C., Costa, C.P., Carneiro, M.S. 2015. Validação de marcadores moleculares associados à pungência em pimenta. Horticultura Brasileira 33, 189-195.

Pino, J., González, M., Ceballos, L., Centurión-Yah, A.R., Trujillo-Aguirre, J., Latournerie-Moreno, L., Sauri-Duch, E. 2007. Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. Food Chemistry 104, 1682–1686.

Pozzobon, M.T., Bianchetti, L.B., Santos, S., Carvalho, S.I.C., Reifschneider, F.J.B., Ribeiro, C.S.C. 2015. Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do banco de germoplasma da Embrapa, Brasil. Brazilian Journal of Biosciences. 13, 96-100 .

Reifschneider, F.J.B. 2000. *Capsicum*: Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Embrapa Hortaliças. 133p.

Reis, L.S., Souza, J.L., Azevedo, C.A.V., Lyra, G.B., Ferreira Junior, R.A., Lima, V.L.A. 2012. Componentes da radiação solar em cultivo de tomate sob condições de ambiente protegido. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 16, 739–744.

Ribeiro, C.S.C., Lopes, C.A., Carvalho, S.I.C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. 2008. Pimentas *Capsicum*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Embrapa Hortaliças. 200p.

Ribeiro, C.S.C., Souza, K.R.R., Carvalho, S.I.C., Reifschneider, F.J.B. 2015. BRS Juruti: the first Brazilian Habanero-type hot pepper cultivar. *Horticultura Brasileira* 33, 527-529.

Rodriguez-Amaya, D.B. 2001. A guide to carotenoid analysis in food. Washington: International Life Sciences Institute. 64 p.

Santos, R.M.C., Rêgo, E.R., Borém, A., Nascimento, M.F., Nascimento, N.F.F., Finger, F.L., Rêgo, M.M. 2014. Epistasis and inheritance of plant habit and fruit quality traits in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetics and Molecular Research* 13, 8876-8887.

Sganzerla, M., Coutinho, J.P., Melo, A.M.T., Godoy, H.T. 2014. Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits. *Food Research International* 64, 718–725.

Sosa-Moguel, O., Pino, J.O., Ayora-Talavera, G., Sauri-Duch, E., Cuevas-Glory, L. 2017. Biological activities of volatile extracts from two varieties of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *International Journal of Food Properties* 20, S3042–S3051.

Ssemwogerere, C. Ochwo-Ssemakula, M.K.N., Kovach, J., Kyamanywa, S., Karungi, J. 2013. Species composition and occurrence of thrips on tomato and

pepper as influenced by farmers' management practices in Uganda. *Journal of Plant Protection Research* 53, 158-164.

Stommel, J.R., Griesbach, R. J. 2008. Inheritance of fruit, foliar, and plant habit attributes in *Capsicum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133, 396–407.

Sweat, K.G., Broatch, J., Borrer, C., Hagan, K., Cahill, T.M. 2016. Variability in capsaicinoid content and Scoville heat ratings of commercially grown Jalapeño, Habanero and Bhut Jolokia peppers. *Food Chemistry* 210, 606–612.

Teodoro, A.F.P., Alves, R.B.N., Ribeiro, L.B., Reis, K., Reifschneider, F.J.B., Fonseca, M.E.N., Silva, J.P., Agostini-Costa, T.S. 2013. Vitamin C content in Habanero pepper accessions (*Capsicum chinense*). *Horticultura Brasileira* 31, 59-62.

Terada, M., Watanabe, Y., Kunitoma, M., Hayashi, E. 1979. Differential rapid analysis ascorbic acid and ascorbic acid 2-sulfate by dinitrophenylhydrazine method. *Annals of Biochemistry* 4, 604-608.

Todorov, J. 1992. Inheritance of the height of red pepper plants for grinding. *Proc. 8th Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*, Rome. p. 96–99.

Ulhoa, A.B., Pereira, T.N.S., Ribeiro, C.S.C., Moita, A.W., Reifschneider, F.J.B. 2017. Obtenção e caracterização morfoagronômica de linhagens de pimenta do tipo Jalapeño Amarelo. *Horticultura Brasileira* 35, 343-348.

Wall, M.M., Waddell, C.A., Bosland, P.W. 2001. Variation in β -Carotene and Total Carotenoid Content in Fruits of *Capsicum*. *HortScience* 36, 746–749.

Zewdie, Y., Bosland, P.W. 2001. Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for *Capsicum* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 29, 161-169.

CAPÍTULO 5. TESTE DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE (DHE) E MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA NOVAS LINHAGENS ENDOGÂMICAS DE PIMENTA HABANERO CANDIDATAS A PROTEÇÃO DE CULTIVARES

RESUMO

O processo de proteção de cultivares visa, principalmente, garantir o direito de propriedade intelectual aos melhoristas de plantas. Para que uma nova cultivar seja protegida é necessária a comprovação de novidade, distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade a partir de ensaios de DHE, seguindo as normas do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC/MAPA). Além do teste de DHE, outros descritores e/ou ferramentas também podem ser acrescentados ao formulário de solicitação da proteção, por exemplo, marcadores moleculares. O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotípica e genotipicamente linhagens endogâmicas avançadas de pimenta Habanero do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, através do teste de DHE, bem como através de marcadores microssatélites visando obter subsídios para o processo de proteção e lançamento de novas cultivares. Ensaios de DHE foram realizados em dois anos consecutivos (2018 e 2019). Foram caracterizadas três linhagens endogâmicas de pimenta Habanero identificadas como CNPH 15.740; CNPH 15.744 e CNPH 15.749 e, como parâmetro de distinguibilidade, foram utilizados dois acessos genitores da população base (CNPH 4215 e CNPH 4159) e as cultivares comerciais BRS Juruti e BRS Nandaia. A caracterização das linhagens e testemunhas foi realizada utilizando-se 48 descritores morfológicos multicategóricos, 13 caracteres agrônômicos quantitativos e 11 *primers* microssatélites. As matrizes de distâncias genéticas obtidas a partir dos descritores morfológicos e marcadores SSR foram utilizadas para realizar as análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se como critério o método do UPGMA. A associação entre as matrizes de distância obtidas por marcadores SSR e por caracteres morfológicos foi estimada com base no teste de correlação de Mantel. O coeficiente de correlação entre caracteres morfológicos e marcadores microssatélites foi considerado baixo (0,352). CNPH 15.749 não apresentou

homogeneidade e estabilidade nos ensaios. CNPH 15.740 e CNPH 15.744 foram distintas entre si e entre os acessos genitores e cultivares para os parâmetros morfológicos, agronômicos e marcadores microsatélites, bem como homogêneas e estáveis nos dois ensaios de DHE. As duas linhagens também possuem importantes atributos, como vigor de planta (CNPH 15.744), elevada produtividade (CNPH 15.740 e CNPH 15.744), precocidade (CNPH 15.744) e resistência às principais doenças (CNPH 15.740). As linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.744 são candidatas promissoras ao processo de proteção de cultivares, bem como apresentam potencial para serem lançadas como novas cultivares para mercado brasileiro de pimentas.

Palavras-chave: *Capsicum chinense*, propriedade intelectual, novas cultivares.

DISTINCTIVENESS, UNIFORMITY AND STABILITY (DUS) AND MICROSATELLITE MARKERS FOR NEW INBRED LINES OF HABANERO PEPPER CANDIDATES FOR CULTIVAR PROTECTION

ABSTRACT

The protection process aims to assure the right of intellectual property to breeders. DUS tests are required to prove novelty, distinctiveness, uniformity and stability of the new cultivar, following the rules of the National Cultivar Protection Service (SNPC/MAPA). Other tools can be added to the protection form, for example, molecular markers. The objective of this study was to to characterize phenotypic and genotypically the three advanced inbred lines through the DUS test, as well as microsatellite markers in order to obtain information for the process of protection and release of new cultivars. CNPH 15.740; CNPH 15.744 and CNPH 15.749 lines, CNPH 4215, CNPH 4159, BRS Juruti and BRS Nandaia were evaluated in two DUS tests (2018 and 2019) using 48 multi-categorical morphological descriptors and 11 microsatellite primers. The genetic distance matrices were used to perform the cluster analysis, using the UPGMA method. Mantel's correlation test was used to estimate the association between distance matrices obtained by SSR markers

and morphological characters. The correlation coefficient was considered low (0.352). CNPH 15.749 not showed homogeneity and stability. CNPH 15.740 and CNPH 15.744 were distinct for the morphological, agronomic and microsatellite markers parameters, as well as homogeneous and stable in the two DUS tests. The lines also presented important and desirable characteristics such as plant vigor (CNPH 15.744), high productivity (CNPH 15.740 and CNPH 15.744), precocity (CNPH 15.744) and resistance to the main diseases (CNPH 15.740). CNPH 15.740 and CNPH 15.744 presented the potential to be submitted to the cultivar protection process and to be released as new Habanero pepper cultivars developed in and adapted to Brazil.

Keywords: *Capsicum chinense*, intellectual property, new cultivars.

1 INTRODUÇÃO

A produção de pimentas vem registrando aumento significativo no Brasil ao longo dos anos (SILVA et al., 2011). Esse aumento se deve, principalmente, ao crescente investimento em programas de melhoramento genético por parte de instituições públicas e privadas de pesquisa, tendo como objetivo o desenvolvimento de novas cultivares mais produtivas e adaptadas às diversas condições de estresses bióticos e abióticos (CARVALHO et al., 2009; RÊGO et al., 2011).

A obtenção de novas cultivares é um processo que demanda tempo, recurso financeiro e dedicação dos melhoristas (MOREIRA et al., 2010). Visando a preservação dos direitos autorais dos obtentores, legislações específicas têm sido criadas em diversos países (SANTOS et al., 2012).

No Brasil, vigora desde 1997 a Lei nº 9.456, denominada Lei de Proteção de Cultivares (LPC), que garante o direito de propriedade intelectual aos melhoristas de plantas (AVIANI & MACHADO, 2015) e segue as diretrizes propostas pela União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais – UPOV, estabelecida em 1961. Outros países, como Estados Unidos, Japão, Alemanha, Austrália, Chile também seguem as diretrizes da UPOV para proteção de novas cultivares (UPOV, 2019). Para a obtenção do certificado de

proteção de cultivares junto ao Serviço de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SNPC/MAPA), é necessário seguir determinadas instruções estabelecidas pela LPC (AVIANI, 2011), dentre elas, a comprovação das características de novidade, clara distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade e denominação própria (SANTOS et al., 2012).

Para o gênero *Capsicum*, os testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) seguem as normas do Ato n.º 2 de 22 de março de 2006, que estabelece o uso de descritores morfológicos multicategóricos, incluindo caracteres qualitativos e quantitativos, avaliados nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta (PIMENTA et al., 2016). Outros descritores e/ou ferramentas também podem ser acrescentados ao formulário de solicitação da proteção, desde que tenham o objetivo de diferenciar cultivares candidatas. Exemplos de testes complementares ao ensaio de DHE são: avaliações de rendimento, resistência a pragas e doenças e uso de marcadores moleculares (MACHADO, 2011).

Os perfis genéticos (*fingerprinting*), obtidos por meio de marcadores moleculares, vêm sendo utilizados no âmbito da proteção de cultivares como ferramenta auxiliar (AVIANI & SANTOS, 2011), apesar de ainda não serem reconhecidos como metodologia oficial. Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, os *Single Sequence Repeat* (SSR), ou microsatélites, são utilizados com sucesso na diferenciação de cultivares, devido à alta reprodutibilidade (TOPPA & JADOSKI, 2013). O uso de marcadores moleculares em avaliações complementares ao teste de DHE já foi descrito em trabalhos realizados com a cultura da soja (GARCIA et al., 2007); café (SOUZA et al., 2017); batata (PEREIRA et al., 2018); *Capsicum* (KWON et al., 2005; MOREIRA et al., 2013), entre outras culturas.

O presente estudo objetivou caracterizar três linhagens endogâmicas avançadas de pimenta Habanero do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, por meio de teste de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE), bem como através marcadores microsatélites visando obter subsídios para o processo de proteção e lançamento de novas cultivares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético e delineamento experimental

Três linhagens avançadas de pimenta Habanero identificadas como CNPH 15.740, CNPH 15.744 e CNPH 15.749, provenientes do programa de melhoramento de *Capsicum* spp. da Embrapa Hortaliças, foram avaliadas em dois ensaios de DHE. Como parâmetro de distinguibilidade, dois acessos genitores (CNPH 4215 e CNPH 4159 - considerados mais próximos morfologicamente das linhagens candidatas à proteção) e as cultivares comerciais BRS Juruti e BRS Nandaia foram utilizadas. Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, localizada em Brasília, Distrito Federal, Brasil, 15°55'59.8" W e 48°08'34.2" S, com altitude de 990 m, nos períodos de janeiro a julho de 2018 (1º ensaio) e de janeiro a julho de 2019 (2º ensaio).

O delineamento experimental utilizado em ambos os ensaios foi blocos casualizados, com sete tratamentos e três repetições. As unidades experimentais foram constituídas por seis plantas por parcela, totalizando 18 plantas avaliadas por genótipo, com espaçamento de 1,0 m entre linhas e 0,40 m entre plantas.

A produção de mudas, o preparo do solo e as práticas culturais e de manejo foram realizados com base nas recomendações para o cultivo de pimentas *Capsicum* propostas por Ribeiro et al. (2008).

Adicionalmente, foi realizada a genotipagem das linhagens selecionadas, de acessos genitores da população base e de cultivares de Habanero, utilizando-se marcadores microssatélites (SSRs), no Laboratório de Genética de Plantas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília, Distrito Federal.

2.2 Ensaios de DHE: Caracterização morfológica

Para a avaliação dos ensaios de DHE foram utilizados 48 descritores morfológicos de *Capsicum* estabelecidos pelo SNPC/MAPA, segundo o Ato n.º 2 de 22 de março de 2006 (Tabela 1; BRASIL, 2006).

A avaliação dos descritores morfológicos qualitativos baseou-se na metodologia de comparação lado a lado, na qual a distinguibilidade é analisada em observação direta dos genótipos nos testes em telado. Nessa condição, as características são observadas visualmente, concedendo-se apenas uma nota por característica para cada genótipo em análise. Para os descritores quantitativos comprimento da haste; comprimento, diâmetro e espessura do pericarpo do fruto; comprimento e espessura do pedúnculo, os dados foram obtidos através de mensurações, com auxílio de régua métrica e/ou paquímetro. Os resultados foram posteriormente agrupados seguindo escalas de notas, conforme as exigências do SNPC/MAPA (Tabela 1; BRASIL, 2011).

Avaliações foram realizadas em frutos imaturos e maduros, advindos do segundo ou terceiro nó. Quando realizadas em folhas, estas estavam completamente desenvolvidas e se encontravam nos brotos secundários laterais, após a primeira ramificação. Com relação às avaliações de flores, foram avaliados botões florais presentes no terceiro nó, após a primeira bifurcação (MOREIRA, 2012).

Os descritores duração do ciclo até o florescimento e duração do ciclo até a maturação, foram avaliados a partir da contabilização do número de dias desde a semeadura das linhagens até a abertura da primeira flor no segundo nó de floração em 50% das plantas e o número de dias para a mudança de coloração dos frutos em 50% das plantas, respectivamente (MOREIRA, 2012).

O número de frutos por planta (NFP) foi calculado a partir do somatório do número de frutos por planta, obtidos em todas as colheitas. A produtividade total (PROD) foi calculada a partir da pesagem de todos os frutos de cada parcela em balança digital (marca Marte® AD4200, São Paulo, SP, Brasil) e o peso total foi extrapolado para $t\ ha^{-1}$. O teor de capsaicinóides foi avaliado utilizando-se o método AOAC Official Method 995.03 (GRYPA, 2011), com adaptações e as leituras foram realizadas por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), cobrindo o intervalo de 750 a 650.000 Unidades de Calor Scoville (SHU).

Tabela 1. Descritores morfológicos qualitativos e quantitativos multicategóricos de *Capsicum* avaliados em ensaios de DHE, conforme recomendação do SNP/CI/MA. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Descritores	Classes fenotípicas	Código	Descritores	Classes fenotípicas	Código	Descritores	Classes fenotípicas	Código
1. Plântula: pigmentação antociânica no hipocótilo ¹	Ausente Presente	1 2	9. Folha: largura ²	Estreita Média Larga	3 5 7	17. Flor: coloração da corola ¹	Branca Branca c/ base violeta Branca com margem violeta Branca esverdeada Branca esverdeada com margem violeta Amarela clara Amarela Amarela esverdeada Violeta c/ base branca Violeta	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2. Planta: posição das hastes ¹	Ereta Semiereta Horizontal Prostrada	1 3 5 7	10. Folha: coloração ¹	Clara Média Escura	3 5 7	18. Flor: mancha da corola ¹	Ausente Presente	1 2
3. Planta: comprimento da haste ²	Curto Médio Longo	3 5 7	11. Folha: variegiação ¹	Ausente Presente	1 2	19. Flor: coloração da mancha na corola ¹	Branca Amarela Verde amarelada Verde Violeta	1 2 3 4 5
4. Planta: entrenós curtos (na parte mais alta) ¹	Ausente Presente	1 2	12. Folha: pigmentação antociânica ¹	Ausente Frac Média Forte	1 3 5 7	20. Flor: coloração da antera ¹	Branca Amarela Amarela com mancha azul Azul pálido Azul Violeta	1 2 3 4 5 6
5. Apenas cultivares com entrenós curtos. Planta: número de entrenós entre a primeira flor e os entrenós curtos (teste a ser feito em plantas sem desbrota) ¹	Nenhum Um a três Mais de três	1 2 3	13. Folha: pilosidade ¹	Ausente Esparsa Média Densa	1 3 5 7	21. Flor: coloração do filamento ¹	Branca Amarela Amarela com mancha azul Azul pálido Azul Violeta	1 2 3 4 5 6
6. Apenas cultivares sem entrenó curto (em brotações laterais primárias): Planta: comprimento do entrenó ¹	Curto Médio Longo	3 5 7	14. Folha: rugosidade ¹	Ausente Frac Média Forte	1 3 5 7	22. Flor: posição do estigma ¹	Inserto Mesmo nível Excerto	3 5 7
7. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós ¹	Ausente Frac Média Forte Muito forte	1 3 5 7 9	15. Flor: número de flores por axila ²	Uma Duas Três ou mais	1 2 3	23. Fruto: coloração antes da maturação ¹	Branco-esverdeada Amarelada Verde Roxa	1 2 3 4
8. Folha: comprimento da lâmina ²	Curto Médio Longo	3 5 7	16. Flor: posição do pedúnculo ¹	Ereta Intermediária Pendente	1 3 5	24. Fruto: intensidade da coloração antes da maturação ¹	Clara Média Escura	3 5 7

Tabela 1. Continuação...

Descritores	Classes fenotípicas	Código	Descritores	Classes fenotípicas	Código	Descritores	Classes fenotípicas	Código
25. Fruto: posição ¹	Ereta	3	33. Fruto: intensidade da coloração na maturidade ^{1,3}	Clara	3	41. Pedúnculo: comprimento ²	Curto	3
	Intermediária	5		Média	5		Médio	5
	Pendente	7		Escura	7		Longo	7
26. Fruto: comprimento ²	Muito curto	1	34. Fruto: brilho ¹	Fraco	3	42. Pedúnculo: espessura ²	Fino	3
	Curto	3		Médio	5		Médio	5
	Médio	5		Forte	7		Grosso	7
	Longo	7						
27. Fruto: diâmetro ²	Muito longo	9						
	Muito pequeno	1	35. Fruto: profundidade da depressão peduncular ¹	Ausente	1	43. Cálise: margem ¹	Inteira	1
	Pequeno	3		Rasa	3		Intermediária	2
	Médio	5		Média	5		Dentada	3
	Grande	7		Profunda	7			
28. Fruto: forma predominante da seção longitudinal ¹	Muito grande	9		Muito profunda	9			
	Achatada	1	36. Fruto: forma do ápice ¹			44. Cálise: constrição anelar ¹		
	Arredondada	2		Aguda	3		Ausente	1
	Cordiforme	3		Arredondada	5		Presente	2
	Quadrangular	4		Deprimida	7			
	Retangular	5						
	Trapezoidal	6						
	Triangular	7						
	Estreito-triangular	8						
	Forma de chifre	9						
	Ovalada	10						
29. Fruto: forma predominante da seção transversal ¹	Elíptica	11						
	Angulada	1	37. Fruto: profundidade dos sulcos interlocares ¹	Ausente	1	45. Cálise: aspecto ¹	Não envolvente	1
	Arredondada	2		Rasa	3		Envolvente	2
		3		Média	5			
30. Fruto: sinuosidade do pericarpo na porção basal ¹				Profunda	7			
	Ausente	1		Muito profunda	9			
	Fraca	3	38. Fruto: número predominante de lóculos ²			46. Fruto: capsaicina na placenta ¹	Ausente	1
	Média	5		Dois	1		Presente	2
31. Fruto: textura da superfície ¹	Forte	7		Dois e três	2			
	Muito forte	9		Três e quatro	3			
				Quatro ou mais	4			
32. Fruto: coloração na maturidade ¹			39. Fruto: espessura do pericarpo ²	Fina	3	47. Ciclo até o florescimento ¹	Precoce	3
	Amarela	1		Média	5		Média	5
	Alaranjada	2		Grossa	7		Tardia	7
33. Fruto: coloração na maturidade ^{1,3}	Fortemente enrugada	3	40. Placenta: tamanho ²			48. Ciclo até a maturação ¹	Precoce	3
	Vermelha	3		Pequeno	3		Média	5
	Marrom	4		Médio	5		Tardia	7
	Roxa	5		Grande	7			

¹ Descritores morfológicos (qualitativos); ² Descritores quantitativos.

Para a avaliação de homogeneidade, considerou-se o número de plantas atípicas nas parcelas. Para ser considerada atípica, a planta deve ser claramente distinta das outras que compõem a cultivar (SANTOS & PACHECO, 2011). Desta forma, considerou-se o padrão de 2% com probabilidade de 95% de ocorrência para plantas fora do padrão, como determinado no Ato Nº 2, de 2006 (BRASIL, 2006). A estabilidade foi avaliada comparando-se os resultados dos descritores para cada linhagem nos dois ensaios. Foram consideradas linhagens estáveis àquelas que apresentaram plantas dentro do padrão de estabilidade ao nível de 95%.

2.3 Análise molecular

Amostras de folíolos de cada linhagem, genitor e cultivar foram coletadas e o DNA genômico extraído por meio do método cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 2% (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998). A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda. Cada amostra foi, então, diluída para a concentração de 3,0 ng/μl.

Reações de amplificação de amostras de DNA de cada acesso foram realizadas utilizando-se 11 pares de *primers* SSR desenvolvidos no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Tabela 1; BUSO et al., 2000; CARVALHO et al., 2015). As reações foram realizadas em volume total de 10 μl composta pela seguinte combinação de reagentes: 5,55 μl de água MilliQ; 1,0 μl de tampão 10X; 0,3 μl de MgCl₂ 50 mM; 0,8 μl de dNTPs 2,5 mM cada; 0,8 μl de BSA 2,5 mg.ml⁻¹, 0,3 μl de *primer* a 5 μM marcados com fluorescências 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarela); 0,25 μl de enzima Taq polimerase (5 U.μl⁻¹) e mais 3 μl de DNA genômico a 3 ng/μl. As reações de amplificação ocorreram da seguinte forma: 95 °C por 15 min para desnaturação, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min à 56 °C para anelamento e 1 min a 72 °C e, ao final, uma extensão de 72 °C por 10 min.

A genotipagem das amostras de DNA foi realizada utilizando-se um sequenciador automático modelo ABI 3730 (*Applied Biosystems*, Foster City,

CA, USA). As amostras foram preparadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) misturando-se 1 µL da reação a 10 µl do agente desnaturante formamida (HiDi) e 1 µl do padrão de peso molecular (ROX). A mistura foi então desnaturada por 5 minutos a 95 °C.

Após a passagem pelo sequenciador, a demarcação dos picos de fluorescência e dos alelos detectados para a obtenção da genotipagem foi feita manualmente com auxílio do *software* GeneMapper versão 4.1 (*Applied Biosystems*), sendo o arredondamento do tamanho dos alelos realizado por meio do *software* AlleloBin (PRASANTH et al., 2006). Por fim, obteve-se uma planilha eletrônica com a identificação de cada planta analisada e os respectivos alelos, presentes em cada um dos 11 *loci* SSR analisados.

Tabela 2. Listagem de iniciadores de SSR utilizados para diferenciação de três linhagens de pimenta Habanero (*Capsicum chinense*), dois genitores parentais e duas cultivares, adaptado de Buso et al., (2016); Carvalho et al. (2015). Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Primers (CA)	Sequência Forward	Sequência Reverse
11	GTTGTTATCTCCTTTTCCCA	AAATGTTAGGAACCTACCAG
29	TGGGTAAAGGTACTTAGTAG	GTTGTATTGCTTTAGCTCAG
36	GGGTAAAGGTACTTAGTAGA	GTTGTATTGCTTTAGCTCAG
49	CTATCTTCGCATATAGGCAG	AATCTCTGTGGCTGACTCAA
136	GTGGACTAACAGACTCAACG	CTGATGATGCAGAACATGAT
159	GCAGAAAATGGGTAAAGGTA	ATTGCTTTAGCTCAGAATGG
167	CATTCTCTTCTTCTCAAACG	CACGTCAATCTGTTGTGAAA
169	CTTTAGCTCAGAATGGTC	TGGGTAAAGGTACTTAGTAG
178	CCCAACTCATTTAATTCCAC	CACGTCAATCTGTTGTGAAA
221	ACCCACTATATACAGAGA	CTAGTTGTATTGCTTTAG
262	TGAGTCTTGCTTTGTTCTGG	GTAAAGGCCGCTCAATCTAC

2.4 Análise estatística

Os dados dos descritores morfológicos foram utilizados para estimar a distância genética entre os acessos utilizando análise de correspondência simples. As matrizes de distâncias genéticas foram utilizadas para realizar as análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se como critério o método do UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*), com auxílio do Programa NTSYS pc 2.1.

A análise de variância conjunta foi realizada para os caracteres quantitativos comprimento da haste; comprimento do entrenó; comprimento e largura da folha; comprimento, diâmetro e espessura do pericarpo do fruto; tamanho da placenta; comprimento e espessura do pedúnculo a fim de estimar os principais efeitos dos genótipos e ensaios, e suas interações (GOMEZ & GOMEZ, 1984). O método de Scott-Knott foi utilizado para agrupar as médias ($p < 0,05$).

As distâncias genéticas obtidas a partir dos marcadores microssatélites foram calculadas com auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013), baseando-se na seguinte fórmula:

$$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$$

sendo: DG_{ij} = Distância genética entre os acessos i e j ; NLC = Número de Locos Coincidentes e NTL = Número Total de locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente).

A matriz de distâncias genéticas obtidas foi utilizada para realizar as análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se como critério de agrupamento, o método do UPGMA, com auxílio do Programa NTSYS pc 2.1.

Por fim, a significância da associação entre as matrizes de distância obtidas por marcadores SSR e por caracteres morfológicos foi estimada com base no teste de correlação de Mantel (MANTEL, 1967) e teste t , também por meio do programa NTSYS pc 2.1.

3 RESULTADOS

Todas as linhagens se diferenciaram em pelo menos uma característica em relação às demais linhagens candidatas à proteção e aos genótipos testemunhas. CNPH 15.740 e CNPH 15.749 foram diferentes morfológicamente para cinco descritores multicategóricos, sendo estes,

coloração da antera, intensidade da coloração antes da maturação do fruto; comprimento de fruto, textura da superfície do fruto e intensidade da coloração na maturidade (Tabela 3). CNPH 15.740 diferiu do acesso genitor CNPH 4159 e da cultivar BRS Juruti, consideradas as testemunhas mais próximas morfologicamente, em 18 (39,6%) e 20 (41,6%) descritores, respectivamente. Considerando a linhagem CNPH 15.744, o acesso 4215 e a cultivar BRS Nandaia, houve distinção em relação à linhagem CNPH 15.740 para 21 (43,7%), 20 (41,6%) e 15 (31,2%) descritores, respectivamente.

CNPH 15.744 diferiu do acesso parental CNPH 4215 em 9 (18,7%) caracteres. Vale ressaltar que a escolha do acesso parental supracitado para os ensaios levou em consideração a elevada similaridade morfológica com a linhagem CNPH 15.744, observada em testes preliminares. Com relação ao acesso genitor CNPH 4159 e as cultivares BRS Nandaia e BRS Juruti a linhagem CNPH 15.744 diferiu em 21 (43,7%), 20 (41,7%) e 18 (37,5%) descritores, respectivamente.

Dois dos 48 descritores utilizados nos ensaios foram considerados ausentes em todas as linhagens e testemunhas avaliadas (Tabela 1), sendo estes: número de entrenós entre a primeira flor e os entrenós curtos (descritor 5), que apenas seria avaliado se a planta apresentasse entrenós curtos, de acordo com o descritor 4; e coloração da mancha na corola (descritor 19), característica ausente nos genótipos avaliados neste trabalho.

Quando considerada a análise conjunta dos descritores quantitativos nos dois ensaios, observa-se que CNPH 15.740 diferiu da linhagem CNPH 15.744, dos acessos genitores CNPH 4215 e CNPH 4159 e da cultivar BRS Juruti para comprimento do entrenó, comprimento da folha, largura da folha, comprimento do fruto, espessura do pericarpo e tamanho da placenta (Tabelas 4 e 5).

A linhagem CNPH 15.744 foi distinta do acesso genitor CNPH 4215 em comprimento da haste, comprimento do entrenó, comprimento da folha, largura da folha, diâmetro do fruto e tamanho da placenta. Os caracteres espessura do pericarpo e espessura do pedúnculo não mostram diferença significativa entre as linhagens e genótipos testemunhas.

CNPH 15.744 apresentou os maiores valores de comprimento de haste, comprimento do entrenó, comprimento da folha e largura da folha, assim como plantas eretas, alto porte e frutos com coloração amarela (Tabelas 3 e 4). CNPH 15.740 e CNPH 15.749 apresentaram valores superiores de comprimento de fruto e tamanho da placenta, além de porte intermediário e frutos vermelhos. A linhagem CNPH 15.740 apresentou elevada produtividade em ambos os ensaios, diferindo significativamente dos acessos genitores e da cultivar BRS Juruti.

Para capsaicina na placenta do fruto, característica de grande importância comercial para pimentas, foi observada a presença de capsaicina em todas as linhagens analisadas, no entanto, com diferentes graus de pungência. Em testes de laboratório, utilizando a técnica de HPLC, verificou-se que a linhagem CNPH 15.740 apresentou a maior concentração de capsaicina nos frutos em ambas as avaliações, com valor médio de 158.068,28 SHU, seguida da linhagem CNPH 15.749, com 114.408,10 SHU. A linhagem CNPH 15.744 possui o menor teor do alcaloide, com apenas 5.830,39 SHU.

Outras características importantes para o cultivo de pimentas são duração do ciclo até o florescimento e até a maturação, as quais representam a precocidade do genótipo. Observa-se que o material CNPH 15.744 diferiu-se das demais linhagens. Observando os dados originais, sem a conversão em dados multicategóricos, a linhagem apresentou, em média, cinco e 12 dias de antecedência no florescimento e maturação dos frutos, respectivamente, quando comparada com as linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.749, permitindo classificá-la como precoce.

CNPH 15.740 e CNPH 15.744 mostraram-se altamente homogêneas e estáveis nos dois ensaios (Tabela 3). No entanto, foi verificada a falta de homogeneidade da linhagem CNPH 15.749 ao se considerar a presença de plantas atípicas para seis descritores, extrapolando o padrão permitido pelo SNPC. Esta falta de homogeneidade também resultou em ausência de estabilidade da linhagem, observada nos dois ensaios.

Tabela 3. Descritores morfológicos multicategóricos com clara distinção em dois ensaios de DHE (2018 e 2019) para três linhagens candidatas à proteção, três acessos genitores e duas cultivares comerciais de pimenta Habanero (*C. chinense*). Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Descritores	CNPH 15740		CNPH 15744		CNPH 15749		CNPH 4215		CNPH 4159		BRS Juruti		BRS Nandaia	
	Ens. 1*	Ens. 2	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 1	Ens. 2	Ens. 1	Ens. 2
1. Plântula: pigmentação antociânica no hipocótilo	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
2. Planta: posição das hastes	3	3	1	1	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3
3. Planta: comprimento da haste	3	3	7	7	3	3	5	5	3	3	3	3	3	3
4. Apenas cultivares sem entrenó curto (em brotações laterais primárias): Planta: comprimento do entrenó	3	3	7	7	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5
5. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós	3	3	1	1	3/1**	3/1	1	1	5	5	1	1	3	3
6. Folha: comprimento da lâmina	3	3	7	7	3	3	5	5	5	5	7	7	3	3
7. Folha: largura	3	3	7	7	3	3	5	5	5	5	5	5	3	3
8. Folha: pilosidade	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3	3
9. Folha: rugosidade	3	3	7	7	3	3	7	7	5	5	5	5	3	3
10. Flor: coloração da antera	4	4	3	3	6	6/4	3	3	4	4	4	4	4	4
11. Flor: posição do estigma	7	7	7	7	5/7	5/7	7	7	7	7	7	7	5	5
12. Fruto: intensidade da coloração antes da maturação	3	3	5	5	3/5	3/5	5	5	3	3	3	3	5	5
13. Fruto: comprimento	9	9	1	1	7	7	1	1	3	3	3	3	3	3
14. Fruto: diâmetro	5	5	9	9	5	5	7	7	7	7	7	7	5	5
15. Fruto: forma predominante da seção longitudinal	7	7	4	4	7/8	7/8	6	6	3	3	3	3	3	3
16. Fruto: textura da superfície	3	3	2	2	1/3	1/3	2	2	1	1	1	1	1	1
17. Fruto: coloração na maturidade	3	3	1	1	3	3	1	1	3	3	3	3	2	2
18. Fruto: intensidade da coloração na maturidade	3	3	7	7	5	5	5	7	5	5	7	7	7	7
19. Fruto: brilho	5	5	7	7	5	5	7	7	7	7	7	7	7	7
20. Fruto: profundidade da depressão peduncular ¹	3	3	3	3	1/3	1/3	3	3	3	3	1	1	1	1
21. Fruto: forma do ápice	3	3	7	7	3	3	7	7	5	7	7	7	3	3
22. Fruto: profundidade dos sulcos interloculares	7	7	7	7	7	7	9	9	9	9	9	9	7	7
23. Fruto: espessura do pericarpo	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	7	7	7
24. Placenta: tamanho	7	7	3	3	7	7	3	3	5	5	5	5	5	5
25. Pedúnculo: comprimento	7	7	7	7	7	7	7	7	3	3	3	3	3	3
26. Ciclo até o florescimento	5	5	3	3	5	5	5	5	3	3	3	3	3	3
27. Ciclo até a maturação	5	5	3	3	5	5	3	3	3	3	3	3	3	3

Tabela

3. Valores médios dos descritores quantitativos - comprimento da haste (cm), comprimento do entrenó (cm), comprimento da folha (cm), largura da folha (cm) e comprimento do fruto (mm) - de três linhagens candidatas à proteção, dois acessos genitores e duas cultivares comerciais de pimenta habanero avaliadas em dois ensaios de DHE. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	Comprimento da haste			Comprimento do entrenó			Comprimento da folha			Largura da folha			Comprimento do fruto		
	Ens. 1*	Ens. 2	Média	Ens.1	Ens.2	Média	Ens.1	Ens.2	Média	Ens.1	Ens.2	Média	Ens. 1	Ens.2	Média
CNPH 15740	22,5 c ¹	22,8 c	22,7 c	8,8 d	9,4 c	9,1 c	15,4 c	15,3 c	15,3 e	9,1 c	8,5 c	8,8 c	64,3 a	68,5 a	66,4 a
CNPH 15744	39,9 a	38,6 a	39,3 a	13,5 a	14,2 a	13,8 a	21,5 a	21,1 a	21,3 a	14,2 a	13,2 a	13,7 a	40,0 d	43,5 b	41,8 b
CNPH 15749	24,4 c	23,5 c	23,9 c	9,4 d	9,8 c	9,6 c	15,6 c	15,3 c	15,4 e	9,0 c	9,5 c	9,2 c	58,8 b	67,6 a	63,2 a
CNPH 4215	34,7 b	33,1 b	33,9 b	11,8 b	12,5 b	12,1 b	17,0 c	16,2 c	16,6 d	11,3 b	10,7 b	11,0 b	43,8 c	47,7 b	45,7 b
CNPH 4159	25,0 c	25,2 c	25,1 c	10,5 c	11,5 b	11,0 b	18,6 b	18,3 b	18,4 c	10,6 b	10,8 b	10,7 b	46,4 c	50,9 b	48,6 b
BRS Juruti	23,5 c	24,9 c	24,2 c	10,6 c	11,8 b	11,2 b	19,8 b	19,2 b	19,5 b	11,0 b	11,0 b	11,0 b	47,6 c	56,3 b	51,9 b
BRS Nandaia	25,7 c	25,4 c	25,6 c	10,8 c	11,2 b	11,0 b	14,2 c	14,0 c	14,1 f	7,6 d	8,2 c	7,9 c	45,8 c	49,7 b	47,7 b
CV (%)	5,6	5,5	8,6	6,6	6,9	7,5	6,2	6,7	5,8	6,8	9,2	10,4	5,3	6,9	8,8

*Ens. 1 – primeiro ensaio de DHE realizado no período de janeiro a julho de 2018, em casa de vegetação. Ens. 2 – segundo ensaio de DHE realizado no período de janeiro a julho de 2019, em casa de vegetação.

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente os genótipos ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 4. Valores médios de diâmetro do fruto (mm), espessura do pericarpo (mm), tamanho da placenta (mm), comprimento do pedúnculo (mm) e espessura do pedúnculo (mm) de três linhagens candidatas à proteção, dois acessos genitores e duas cultivares comerciais de pimenta habanero avaliadas em dois ensaios de DHE. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

Genótipos	Diâmetro do fruto			Espessura do pericarpo			Tamanho da placenta			Comprimento do pedúnculo			Espessura do pedúnculo		
	Ens. 1	Ens. 2	Média	Ens.1	Ens.2	Média	Ens.1	Ens.2	Média	Ens.1	Ens. 2	Média	Ens. 1	Ens.2	Média
CNPH 15740	33,1 c	34,6 c	33,8 c	2,0 a	1,7 a	1,9 a	44,5 a	48,1 a	46,3 a	41,4 a	39,5 a	40,4 a	2,8 a	3,1 a	3,0 a
CNPH 15744	41,2 a	44,3 a	42,7 a	2,0 a	1,6 a	1,8 a	19,9 c	20,3 c	20,1 d	40,7 a	40,8 a	40,8 a	2,9 a	3,3 a	3,1 a
CNPH 15749	34,1 c	35,4 c	34,7 c	2,2 a	1,8 a	1,9 a	41,6 a	46,4 a	44,0 a	42,9 a	40,5 a	41,7 a	2,8 a	2,9 a	2,8 a
CNPH 4215	37,3 b	36,9 b	37,1 b	1,7 a	1,8 a	1,7 a	22,5 c	34,8 b	28,7 c	43,1 a	41,1 a	42,1 a	2,6 a	3,0 a	2,8 a
CNPH 4159	36,0 b	38,7 b	37,4 b	1,9 a	1,9 a	1,9 a	31,6 b	35,5 b	33,5 c	34,2 b	36,1 b	35,1 b	2,9 a	3,1 a	3,0 a
BRS Juruti	37,5 b	38,1 b	37,8 b	2,0 a	1,7 a	1,8 a	34,1 b	42,7 a	38,4 b	32,1 b	35,7 b	33,9 b	2,8 a	3,2 a	3,0 a
BRS Nandaia	32,3 c	33,1 c	32,7 c	2,3 a	2,0 a	2,1 a	32,7 b	36,0 b	34,4 c	34,4 b	34,5 b	34,4 b	2,9 a	3,1 a	3,0 a
CV (%)	5,4	3,5	6,5	8,7	9,5	12,0	8,9	10,0	10,5	6,7	5,6	8,3	4,3	5,4	6,7

*Ens. 1 – primeiro ensaio de DHE realizado no período de janeiro a julho de 2018, em casa de vegetação. Ens. 2 – segundo ensaio de DHE realizado no período de janeiro a julho de 2019, em casa de vegetação.

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente os genótipos ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Com relação a análise de dissimilaridade genética utilizando marcadores microssatélites observou-se a formação de seis grupos (Figura 2), sendo o grupo I formado pela linhagem CNPH 15.740, o grupo II pela 'BRS Nandaia'; grupo III pela linhagem CNPH 15.744; o grupo IV pelo acesso CNPH 4215; grupo V pela linhagem CNPH 15.749 e a cultivar BRS Juruti e o grupo VI pelo acesso CNPH 4159.

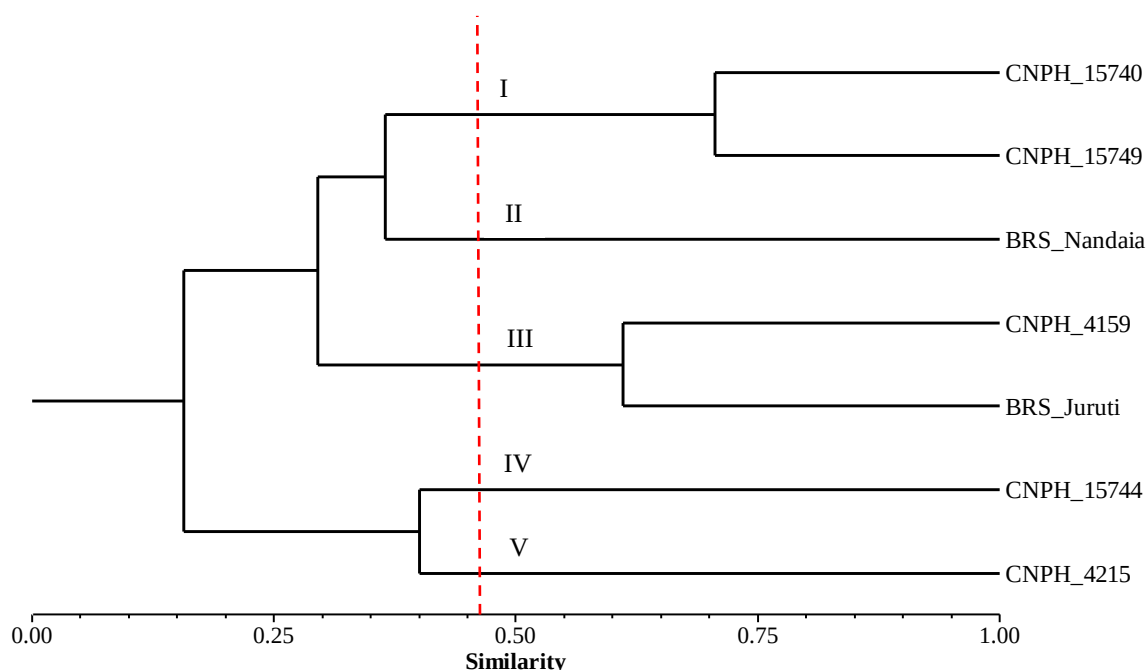


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas (UPGMA), com base em descritores multicategóricos em três linhagens candidatas à proteção, dois acessos genitores (CNPH 4215 e CNPH 4159) e em duas cultivares comerciais de pimenta Habanero. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

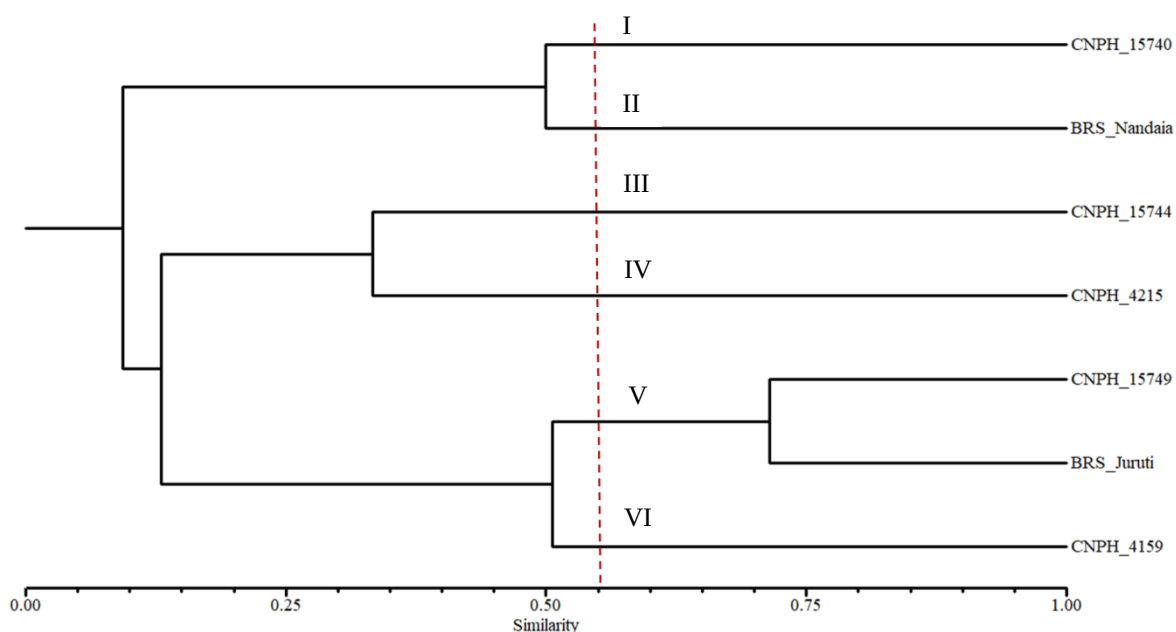


Figura 2. Dendrograma de similaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas (UPGMA), com base em marcadores microssatélites (SSRs) em três linhagens candidatas à proteção, dois acessos genitores (CNPH 4215 e CNPH 4159) e em duas cultivares comerciais de pimenta Habanero. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

O coeficiente de correlação cofenético (r) foi de 0,97 para as análises dos 48 descritores morfológicos e de 0,94 para a análise molecular, evidenciando consistência no ajuste entre a matriz de similaridade genética obtida pelo complemento aritmético de Jaccard e as análises de agrupamento.

A correspondência entre as matrizes de similaridade baseado em SSR e características morfológicas foi testada em uma análise de correlação (Figura 3). O coeficiente de correlação foi 0,352. Verificou-se correlação positiva, porém de magnitude baixa, indicando que as análises morfológicas e moleculares não apresentam exatamente as mesmas informações e os mesmos agrupamentos.

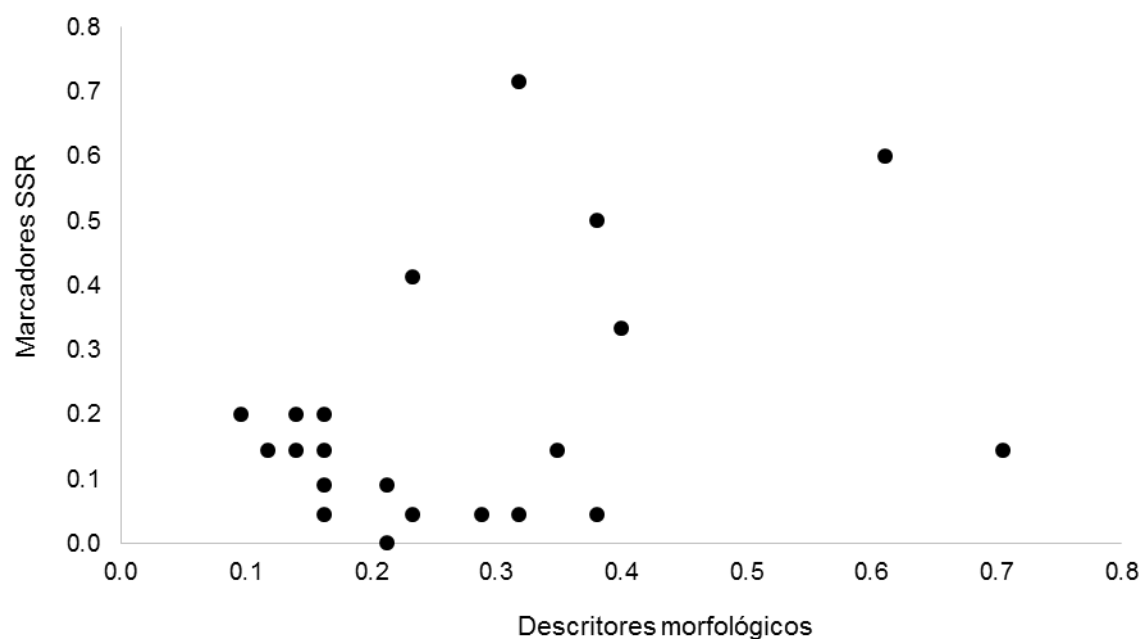


Figura 3. Comparação entre distância morfológica e molecular pelo teste de Mantel (1967). O coeficiente de correlação é 0,352. Brasília-DF, Embrapa Hortaliças, 2019.

4 DISCUSSÃO

A pimenta Habanero é originária da bacia Amazônica, local em que se concentra a maior diversidade genética da espécie *C. chinense* (RIBEIRO et al., 2015). Parte desta diversidade é mantida em bancos de germoplasma, a exemplo da Embrapa Hortaliças que preserva em seu BAG cerca de 540 acessos classificados como *C. chinense* e que constituem a base dos programas de melhoramento genético da espécie na instituição (NASS et al., 2015). Estes acessos são fundamentais para o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às condições de cultivo brasileiras e com características que atendam a demanda de mercado. Parte dos acessos de *C. chinense* preservados no BAG da Embrapa Hortaliças foram utilizados para o desenvolvimento da população base de pimenta Habanero (NASS et al., 2015) que deu origem às três linhagens candidatas a proteção, objetos do presente estudo.

A lei de proteção de cultivares em vigor tem como pilar fundamental a garantia dos direitos autorais e intelectuais dos obtentores (CARVALHO et al., 2009). O teste de DHE é a ferramenta utilizada pelos melhoristas para demonstrar a novidade de suas linhagens candidatas a proteção quando

comparadas às cultivares já disponíveis no mercado, ou mesmo aos acessos genótipos que deram origem a estas novas linhagens (AVIANI & MACHADO, 2015). No presente trabalho, todas as linhagens se diferenciaram entre si em no mínimo cinco características.

A ausência de determinados descritores ou de distinguibilidade entre as linhagens pode ser atribuída às características da espécie a qual os materiais em estudo pertencem. Por exemplo, características de flores, como mancha na corola e coloração da mancha na corola é principalmente observado em espécies como *C. baccatum* e *C. praetermissum* (MCLEOD et al., 1982; PIMENTA et al., 2016), sendo ausente em flores de *C. chinense*. Desta forma, é possível inferir que são descritores não responsivos em testes de DHE para caracterização de linhagens das demais espécies de *Capsicum*. Por outro lado, constrição anelar do pedúnculo é um descritor-chave na diferenciação de *C. chinense* (PRINCE et al., 1995; WANG & BOSLAND, 2006; DAGNOKO et al., 2013) em relação às demais espécies domesticadas.

Descritores como coloração verde da folha, intensidade e coloração dos frutos antes e após a maturação, por exemplo, podem gerar falta de homogeneidade e estabilidade pela simples troca de avaliador nos diferentes períodos de caracterização (PIMENTA et al., 2016). Para minimizar possíveis erros de avaliação, o uso de equipamentos ou tabelas de cores, tais como colorímetros digitais ou sistemas de cores, são fortemente indicados. No entanto, quando não há estas ferramentas à disposição, o treinamento e o conhecimento específico dos avaliadores sobre a cultura são imprescindíveis (GILLILAND & GENSOLLEN, 2010).

Segundo Machado (2011), um descritor útil em testes de DHE é aquele que permite a diferenciação entre genótipos candidatos e testemunhas de forma clara e concisa. No presente estudo 27 descritores possibilitaram a distinção entre as linhagens selecionadas, os acessos genitores e as cultivares comerciais de Habanero. Pimenta et al. (2016) ao avaliarem linhagens endogâmicas de pimenta jalapeño (*C. annuum*), obtiveram 28 descritores com clara distinção entre linhagens e variedades comerciais. Ao considerar o número de características que possibilitaram a distinção entre as linhagens,

genitores e cultivares neste estudo (acima de 50% do total de descritores), é possível inferir que houve clara diferenciação entre os materiais a partir destes descritores.

As linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.744 foram altamente homogêneas e estáveis nos ensaios de DHE, estando dentro dos padrões exigidos pelo SNPC ao apresentarem ausência de plantas atípicas e uniformidade nos dois testes. O SNPC estipula que apenas 2%, com probabilidade de 95%, das plantas de cada cultivar candidata à proteção pode apresentar ocorrência de plantas atípicas em cultivo protegido. (AVIANI & MACHADO, 2015).

Pimenta et al. (2016) apontam que o teste de estabilidade para variedades autopolinizadas permite a comprovação do nível de homozigose e da ausência de contaminantes. Os autores atribuíram a falta de homogeneidade e estabilidade em linhagens de pimenta jalapeño a uma eventual contaminação pela mistura de sementes, uma vez que todas as linhagens apresentaram altos níveis de homozigose na geração F₉. Possivelmente o mesmo fator pode ter ocorrido com a linhagem CNPH 15.749, visto que em testes preliminares foi observada elevada homogeneidade da linhagem em quinta geração de autofecundação. Devido à ausência de homogeneidade e estabilidade, a linhagem CNPH 15.749 não será submetida, neste momento, ao processo de proteção de cultivares. No entanto, o genótipo será avançado por mais algumas gerações até que haja alta homogeneidade entre plantas.

Ao considerar os dados quantitativos (Tabelas 4 e 5), observa-se bom desempenho da linhagem CNPH 15.744 para os descritores relacionados à planta e folha. Em estudo preliminar em condição de campo e casa de vegetação, CNPH 15.744 apresentou hábito de crescimento ereto, porte alto e altura de primeira bifurcação acima de 30 cm, sendo considerada uma linhagem altamente vigorosa. Estas características são desejáveis, principalmente, quando se adota a colheita mecanizada (GOMES et al., 2019) e facilita o manejo durante a condução da cultura e também a colheita manual dos frutos. Outra característica de destaque da linhagem CNPH 15.744 é o alto

rendimento em cultivo protegido, podendo alcançar 35 t ha⁻¹, sendo superior ao das cultivares comerciais BRS Nandaia e BRS Juruti (RIBEIRO et al., 2016).

CNPH 15.744 também apresenta coloração amarela intensa e baixa concentração de capsaicinóides, podendo ser direcionada, além do mercado de frutos frescos, ao de pápricas e pimenta em flocos. CNPH 15.740 é um material altamente picante e apresenta valores de SHU mais elevados que as pimentas mais apreciadas e consumidas no Brasil, como a pimenta malagueta (*C. frutescens*), que geralmente tem níveis de SHU de 100.000 (RIBEIRO et al., 2008) e pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*), com cerca de 90.000 SHU (CARVALHO et al., 2009). A linhagem CNPH 15.740 é uma candidata à produção de pastas picantes (*mash*), usados na fabricação de molhos pela indústria. CNPH 15.740 também apresenta alta resistência a *Potato virus Y* e *Ralstonia pseudosolanacearum*, além de resistência moderada a *Phytophthora capsici* e *Pepper yellow mosaic virus*, sendo indicada para cultivos em áreas com a presença desses patógenos.

Os resultados obtidos nas análises de agrupamento pelo método UPGMA, realizadas com base nas matrizes de dissimilaridade genética utilizando descritores morfológicos e marcadores moleculares, evidenciaram baixa correlação entre as duas metodologias de avaliação (Figura 3). O coeficiente de correlação reduzido observado foi semelhante ao encontrado por Bered et al. (2001), que avaliaram características morfológicas e marcadores RAPD. Carvalho et al. (2014) também obtiveram correlação baixa ($r = 0.56$) ao avaliarem genótipos de *C. chinense* e *C. frutescens* por meio de descritores morfológicos e marcadores SSR. Kwon et al. (2005) afirmam que há várias razões para a baixa associação entre as duas metodologias. Segundo os autores, a análise de SSR mede a variação genética principalmente em sequências não codificantes que, provavelmente, têm um impacto relativamente menor no fenótipo. Outro ponto é que características morfológicas quantitativas são afetadas pelas condições ambientais e, portanto, mostram variações consideráveis e, finalmente, encontrar uma alta correlação entre SSR e dados morfológicos pode depender do número de marcadores microssatélites e caracteres morfológicos disponíveis para

comparação. Possivelmente, quanto mais marcadores e caracteres morfológicos avaliados, mais robusta será a correlação.

Mesmo que o uso de marcadores microssatélites não seja obrigatório para o processo de proteção de cultivares, segundo a lei nº 9.456 (AVIANI & MACHADO, 2015), o seu emprego deve ser estimulado nos testes de comparação de linhagens, devido ao fato de não serem afetados pelo estágio de crescimento das plantas, condições climáticas, localização e práticas agrônômicas (KWON et al., 2005), além de ter alto poder discriminatório, herança codominante e serem altamente multialélicos (BUSO et al., 2016). Moreira et al. (2013) reforçam que o uso de marcadores moleculares é uma abordagem útil e poderosa para uma análise genômica detalhada e, juntamente com a caracterização morfológica, pode fornecer informações mais precisas e concisas para a diferenciação de linhagens candidatas a proteção de cultivares.

Através dos dois testes de agrupamentos foi possível distinguir as linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.744 entre si e dos acessos genitores (CNPH 4215 e CNPH 4159) e das cultivares BRS Juruti e BRS Nandaia. A adoção conjunta de descritores morfológicos e marcadores moleculares em estudos de distinção de genótipos vêm sendo utilizado com êxito. Gonçalves et al. (2009), ao caracterizarem acessos de um banco de germoplasma de tomate, obtiveram elevada associação entre caracteres morfoagronômicos e moleculares, possibilitando distinguir acessos de tomateiro com alta eficiência. Moreira et al. (2013) ao avaliarem linhagens de *C. annuum* candidatas a proteção de cultivares concluíram que o uso de descritores multicategóricos e marcadores ISSRs foram capazes de distinguir as linhagens com potencial para serem lançadas como novas cultivares.

5 CONCLUSÃO

As linhagens CNPH 15.740 e CNPH 15.744 são candidatas promissoras ao processo de proteção de cultivares junto ao SNPC/MAPA por apresentarem distinguibilidade morfológica e molecular, homogeneidade e estabilidade de frutos e plantas.

Evidenciou-se por meio da correlação positiva entre descritores morfológicos e moleculares SSR, apesar da baixa magnitude, que as duas metodologias são importantes em testes de DHE e que uma não substitui a outra, mas se complementam.

6 REFERÊNCIAS

AVIANI, D.M.; MACHADO, R.M. União internacional para proteção das obtenções vegetais (UPOV). In: **Proteção de cultivares no Brasil**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 17-22, 2011.

AVIANI, D.M. Proteção de cultivares no Brasil. In: **Proteção de cultivares no Brasil**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 27-33, 2011.

AVIANI, D.M., SANTOS, F.S. **Uso de Marcadores Moleculares em Proteção de Cultivares**. IN: Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proteção de Cultivares no Brasil / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 155-160, 2011.

AVIANI, D.M.; MACHADO, R.Z. Proteção de Cultivares e Inovação. In: BUAINAIN, A.M.; BONACELLI, M.B.M.; MENDES, C.I.C. (Org.). **Propriedade Intelectual e Inovações na Agricultura**. 1ed.Brasília; Rio de Janeiro: CNPq, FAPERJ, INCT/PPED, IdeiaD, v. 1, p. 225-243, 2015.

BERED, F.; BARBOSA-NETO, J.F.; ROCHA, B.M.; CARVALHO, F.I.F. Genetic variability in common wheat based on morphological traits, coefficients of parentage and RAPDs. **Journal of New Seeds**, v. 3, p. 73-87, 2001.

BRASIL (2006) Ato n.º2 de 22 de março de 2006. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de pimentão e pimenta (*Capsicum* spp.). **Diário oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, 27 de março de 2006, p. 7, seção 1.

BUSO, G.S.C.; REIS, A.M.M.; AMARAL, Z.P.S.; FERREIRA, M.E. Novel and highly informative *Capsicum* SSR markers and their cross-species transferability. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1-13, 2016.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 135-138, 2009.

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.; RAGASSI, C.F.; BIANCHETTI, L.B.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; BUSO, G.S.C.; FALEIRO, F.G. Morphological and genetic relationships between wild and domesticated forms of peppers (*Capsicum frutescens* L. and *C. chinense* Jacquin). **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 7447-7464, 2014.

CARVALHO, S.I.C.; RAGASSI, C.F.; OLIVEIRA, L.B.; AMARAL, Z.P.S.; FALEIRO, F.G.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; BUSO, G.S.C. Transferability of microsatellite markers of *Capsicum annuum* L. to *C. frutescens* L. and *C. chinense* Jacq. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 7937-7946, 2015.

CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 38, p. 547-552, 2016.

DAGNOKO, S.; YARO-DIARISSO, N.; SANOGO, P.N.; ADETULA, O.; DOLO-NANTOUMÉ, A.; GAMBY-TOURÉ, K.; TRAORÉ-THÉRA, A.; KATILÉ, S.; DIALLO-BA, D. Overview of pepper (*Capsicum* spp.) breeding in West Africa. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 1108-1114, 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

GARCIA, A.F.; ALBERINI, J.L.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Microsatellite molecular markers in the cultivar identification of Brazilian soybean for human

consumption. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p. 155-164, 2007.

GILLILAND, T.J.; GENSOLLEN, V. Review of the protocols used for assessment of DUS and VCU in Europe Perspectives. In: HUYGHE, C. (eds). **Sustainable use of genetic diversity in forage and turf breeding**. Springer Netherlands. p. 261-275, 2010.

GOMES, L.M.; RIBEIRO, C.S.C.; RAGASSI, C.F.; SILVA, L.S.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Advanced lines of Jalapeño pepper with potential for mechanical harvesting. **Ciência Rural**, v. 49, e20180222, 2019.

GOMEZ, K.A.; GOMEZ, A. **Statistical procedures for agricultural research**, 2nd Ed. Wiley, New York, 1984.

GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JUNIOR, A.T.; KARASAWA, M.; SUDRE, C.P. Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 364-374, 2009.

GRYPA, R. Spices and other condiments. In: HORWITZ W; LATIMER GW. (eds). **Official methods of analysis of association of official analytical chemists international**. Gaithersburg: AOAC. p.14-15, 2011.

KWON, Y.S.; LEE, J.M.; YI, G.B.; YI, S.I. Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. **Molecules and Cells**, v. 19, p. 428-435, 2005.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MACHADO, R.M. Elaboração de diretrizes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE). In: **Proteção de cultivares no Brasil**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 121-142. 2011.

MCLEOD, M.J.; GUTTMAN, S.I.; ESHBAUGH, W.H. Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). **Economic Botany**, v. 36, p. 361-368, 1982.

MOREIRA, S.O.; SILVA, M.G.M.; RODRIGUES, R.; VIANA, A.P.; PEREIRA, M.G. Breeding methods and history of bean cultivars released in CBAB – Crop Breeding and Applied Biotechnology. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 345-350, 2010.

MOREIRA, S.O.; RODRIGUES, R.; OLIVEIRA, H.S.; MEDEIROS, A.M.; SUDRÉ, C.P.; GONÇALVES, L.S.A. Phenotypic and genotypic variation among *Capsicum annuum* recombinant inbred lines resistant to bacterial spot. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 1232-1242, 2013.

MARINHO, C.D.; MARTINS, F.J.O.; AMARAL, S.C.S.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; GONÇALVES, L.S.A.; MELLO, M.P. Revisiting the Brazilian scenario of registry and protection of cultivars: an analysis of the period from 1998 to 2010, its dynamics and legal observations. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 792-809, 2011.

NASS, L.L.; SOUZA, K.R.R.; RIBEIRO, C.S.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Synthesis of a base population of Habanero pepper. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 530-532, 2015.

PEREIRA, A.S.; SILVA, G.O.; BERTONCINI, O.; CASTRO, C.M.; BORTOLETTO, A.C. BRS F63 (Camila): A fresh market potato cultivar, with high yield potential and resistance to virus Y. **Horticultura Brasileira**, v. 36, p. 136-140, 2018.

PIMENTA, S.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; MORAES, J.G.T.; BENTO, C.S.; MEDEIROS, A.M. Protecting vegetable cultivars in Brazil: a chili pepper case-study research. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 161-167, 2016.

PRASANTH, V.P.; CHANDRA, S.; JAYASHREE, B.; HOISINGTON, D. AlleloBin - A program for allele binning of microsatellite markers based on the the algorithm of Idury and Cardon (1997). **Genome Research**, v. 7, p. 1104-1109, 2006.

RÊGO, E.R; RÊGO, M.M.; CRUZ, C.D.; FINGER, F.L.; CASALI, V.W.D. Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality and

yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p. 909-918, 2011.

RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, C.A.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Embrapa Hortaliças. 2008. 200p.

RIBEIRO, C.S.C.; SOUZA, K.R.R.; CARVALHO, S.I.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. BRS Juruti: the first Brazilian Habanero-type hot pepper cultivar. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 527-529, 2015.

SANTOS, F.S.; PACHECO, L.G.A. Testes de DHE. In: **Proteção de cultivares no Brasil**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 161-167, 2011.

SANTOS, F.S.; AVIANI, D.M.; HIDALGO, J.A.F.; MACHADO, R.Z.; ARAÚJO, S.P. Evolution, importance and evaluation of cultivar protection in Brazil: the work of the SNPC. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** S2, p. 99-110, 2012.

SOUZA, T.V.; CAIXETA, E.T.; ALKIMIM, E.R.; OLIVEIRA, A.C.B.; PEREIRA, A.A.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N.S. Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. **Euphytica** v. 213, p. 1-15, 2017.

TOPPA, E.V.B.; JADOSKI, C.J. O Uso dos Marcadores Moleculares no melhoramento Genético de Plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, p. 1-5, 2013.

UPOV (2019) **União internacional para a proteção das obtenções vegetais**. Pesquisado em <<https://www.upov.int/export/sites/upov/members/en/pdf/pub423.pdf>> Acessado em 23/10/2019.

WANG, D.; BOSLAND, P. The genes of *Capsicum*. **HortScience**, v. 41, p. 1169-1187, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grupo de pimenta Habanero, assim como vários outros grupos de pimentas do gênero *Capsicum*, apresenta grande importância socioeconômica, estando presente na culinária de várias regiões que utilizam essa especiaria como forma de agregar sabor, cor e aroma ao alimento. É, comumente, a principal fonte de renda para muitos agricultores familiares. Vale destacar, também, que alguns tipos de pimenta Habanero possuem importantes compostos nutricionais benéficos à saúde humana.

Observa-se que a demanda por pimentas do grupo Habanero vem aumentando consideravelmente, tanto no cenário nacional quanto internacional. Essa demanda explica-se pela elevada versatilidade deste tipo de pimenta, podendo ser utilizada de diferentes formas e em diferentes nichos.

Diante da importância, demanda e escassez de cultivares adaptadas no mercado nacional, justifica-se a necessidade de se desenvolver novas cultivares de pimenta Habanero com características promissoras e que atendam às necessidades do produtor, bem como do mercado consumidor.

O programa de melhoramento genético da Embrapa Hortaliças tem obtido êxito no desenvolvimento de novas cultivares devido, principalmente, a disponibilidade de um valioso banco de germoplasma contendo acessos altamente diversificados. Esta diversidade permitiu o estabelecimento de uma população base de pimenta Habanero de ampla variabilidade genética, representando uma importante fonte de recursos genéticos para o atual e também para os futuros programas de melhoramento genético, resultando no desenvolvimento de três linhagens endogâmicas com características promissoras para o mercado de pimentas.

CNPH 15.740 e CNPH 15.744 apresentaram características importantes e desejáveis, como alta produtividade, tamanho adequado de plantas (100.0–150.0 cm) e qualidade superior de frutos em ambiente protegido (CNPH 15.744); potencial de cultivo em campo aberto com alto rendimento (35,0 a 40,0 t ha⁻¹; CNPH 15.740); superioridade nas características dos frutos, menor acidez titulável total (15–22%); resistência genética aos patógenos *Ralstonia*

pseudosolanacearum, *Potato virus Y*, *M. javanica*, *Phytophthora capsici* (CNPH 15.740) e a *M. incognita* (CNPH 15.740 e CNPH 15.744). Portanto, as linhagens supracitadas são fortes candidatas ao processo de proteção de cultivares, bem como apresentam potencial para serem lançadas como novas cultivares para o mercado brasileiro.

De maneira geral, os resultados deste estudo podem impactar direta e indiretamente os produtores brasileiros de pimentas. A disponibilização de novas cultivares mais produtivas, adaptadas e com características promissoras deverá contribuir para o desenvolvimento socioeconômico das regiões produtoras.