

**RENATO DE SOUZA BRAGA**

**IDENTIFICAÇÃO DE FONTES E HERANÇA DA RESISTÊNCIA AO *Pepper yellow mosaic virus* – LINS E OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE PIMENTÃO**

**Botucatu**

**2019**



**RENATO DE SOUZA BRAGA**

**IDENTIFICAÇÃO DE FONTES E HERANÇA DA RESISTÊNCIA AO *Pepper yellow*  
*mosaic virus* – LINS E OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE PIMENTÃO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Horticultura).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

**Botucatu**

**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B813i	Braga, Renato de Souza, 1974- Identificação de fontes e herança da resistência ao <i>Pepper yellow mosaic virus</i> - Lins e obtenção de híbridos de pimentão / Renato de Souza Braga. - Botucatu: [s.n.], 2019 43 p.: fots. color., tabs.  Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2019 Orientador: Marcelo Agenor Pavan Inclui bibliografia  1. Pimentão - Resistência a doenças e pragas. 2. Virus de plantas. 3. Pimentão - Melhoramento genético. I. Pavan, Marcelo Agenor. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.
-------	--

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Título: **“IDENTIFICAÇÃO DE FONTES E HERANÇA DA RESISTÊNCIA AO *Pepper yellow mosaic virus* – LINS E OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS DE PIMENTÃO”**

AUTOR: RENATO DE SOUZA BRAGA

ORIENTADOR: MARCELO AGENOR PAVAN

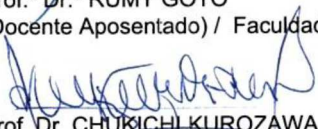
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCELO AGENOR PAVAN  
(Docente Aposentado) / Faculdade de Ciências Agrômicas



Prof.ª Dr.ª RUMY GOTO  
(Docente Aposentado) / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu



Prof. Dr. CHUKICHI KUROZAWA  
(Docente Aposentado) / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu



DR. ROMULO FUJITO KOBORI  
Fitopatologia / Sakata Seed Sudamerica Ltda



Doutor ANIELLO ANTONIO CUTOLO FILHO  
Fitopatologia / SAKATA SEED SUDAMERICA LTDA.

Botucatu, 17 de janeiro de 2019.



*A minha família por ser sempre meu porto seguro,  
dedico*



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre me acompanhar.

Aos meus queridos pais e irmãos pelo apoio incondicional.

A minha esposa, Kátia, pelo carinho, amor e parceria na vida.

Ao meu filho Felipe, pelo carinho e por compreender as muitas ausências do pai por viagens a trabalho ou a estudo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan, pela orientação, ensinamentos, paciência e exemplo de profissional e de pessoa.

À Sakata Seed Sudamerica pelo apoio e estímulo ao meu aprimoramento.

Ao departamento de Horticultura da FCA/Unesp por me abrir as portas para a realização do doutorado.

Aos professores do curso de pós-graduação, pela dedicação e disposição em transmitir conhecimento, tarefa tão nobre e importante.



***“Não sou nada.***

***Nunca serei nada.***

***Não posso querer ser nada***

***À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo”.***

Fernando Pessoa



## RESUMO

O *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) é o mais importante *Potyvirus* infectando plantas do gênero *Capsicum* no Brasil. Desordens fisiológicas comprometem folhas e frutos, tornando-os impróprios para a comercialização. Perdas podem chegar a 100% caso a infecção ocorra no início do cultivo. A resistência genética é a principal forma de controle desta virose. Em 2009 um novo isolado denominado PepYMV-Lins foi detectado quebrando a resistência genética das cultivares comerciais. Este trabalho visou buscar fontes de resistência a este novo isolado, estudar a herança da resistência, incorporar em linhas elites e criar novos híbridos de pimentões resistentes e com boa performance agrônômica. Dentre os acessos do banco de germoplasma da empresa Sakata, foram encontradas seis pimentas e dois pimentões que portavam resistência conjunta aos isolados PepYMV e PepYMV-Lins. Estes dois últimos foram escolhidos para continuar os trabalhos de introdução de resistência. O estudo de herança apontou que a resistência genética nos dois acessos de pimentões é monogênica e recessiva. Eles foram cruzados com as linhagens elites de pimentões da empresa com o objetivo de criar híbridos comerciais do tipo cônico. Para acelerar o trabalho de melhoramento foi utilizada a técnica de criação e estabilização de linhagens via duplo haploide. As novas linhagens geradas por esta metodologia foram cruzadas para geração de híbridos. Os novos híbridos mostraram-se resistentes aos isolados PepYMV e PepYMV-Lins. Foram também avaliados em condições de campo para seleção de híbridos com potencial comercial. Dois deles (AF23571 e AF23579) foram identificados com estabilidade agrônômica e resistência, e estão em fase pré-comercial pela empresa. Eles podem contribuir para a produção de pimentão do Brasil caso o isolado PepYMV- Lins aumente sua dispersão no território nacional.

**Palavras-chave:** *Potyvirus*, PepMV-Lins, *Capsicum annum*, híbridos resistentes



## ABSTRACT

The *Pepper yellow Mosaic virus* (PepYMV) is the most important *Potyvirus* infecting plants of *Capsicum* genus in Brazil. Physiological disorders compromise leaves and fruits, making them unfit for commercialization. Losses can reach 100% if the infection occurs at the beginning of the crop. Genetic resistance is the main way to control this virus. In 2009 a new isolate called PepYMV-Lins was detected breaking the genetic resistance of the commercial varieties. This work aimed to look for sources of resistance to this new isolate, to study the inheritance of resistance, to incorporate in elite inbred lines and to create new hybrids of resistant peppers with good agronomic performance. Among the accessions of the germplasm bank of the company Sakata were six hot peppers and two sweet peppers that carried resistance to PepYMV and PepYMV-Lins isolates. The latter two were chosen to continue the work of introducing resistance. The genetic inheritance study indicated that the genetic resistance in the two accessions of sweet peppers is monogenic and recessive. They were crossed with the company's elite inbred lines with the aim of creating commercial varieties of the conic type. To accelerate the breeding work, the technique of creation and stabilization of double-haploid lines was used. The new inbred lines generated by this methodology were crossed for generation of hybrids. The newly created hybrids were resistant to PepYMV and PepYMV-Lins isolates. They were also evaluated under field conditions for selection of hybrids with commercial potential. Two hybrids were therefore identified with high agronomic stability and resistance, being AF23571 and AF23579 that are in pre-commercial phase by the company. They may contribute to Brazil's sweet pepper production if the new *Potyvirus* isolate increases its dispersion in the national territory.

**Keywords:** PepYMV, PepMV-Lins, *Capsicum*, resistant hybrids



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1	O Pimentão .....	18
2.2	O mosaico causado por <i>Potyvirus</i> .....	19
2.3	Resistência genética .....	20
2.4	Duplo haploide .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1	Localização experimental .....	22
3.2	Seleção de fontes de resistência a PepYMV e PepYMV-Lins .....	23
3.3	Inoculações com PepYMV e PepYMV-Lins .....	23
3.4	Cruzamento das fontes de resistência com linhagens elites .....	26
3.5	Estudo da herança genética da resistência para PepYMV e PepYMV-Lins .....	27
3.6	Coleta de anteras e produção de linhagens duplo haploides .....	27
3.7	Climatização das plântulas e inoculação das linhagens duplo haploides .....	28
3.8	Seleção agronômica das melhores linhagens .....	28
3.9	Desenvolvimento de híbridos de pimentão com potencial agronômico e resistência a PepYMV e PepYMV-Lins .....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1	Seleção de fontes de resistência a PepYMV e PepYMV-Lins .....	29
4.2	Cruzamento das fontes de resistência com linhagens elites .....	32
4.3	Estudo da herança genética da resistência para PepYMV e PepYMV-Lins .....	32
4.4	Produção de linhagens duplo haploides e seleção da resistência conjunta ao PepYMV e PepYMV-Lins .....	33
4.5	Desenvolvimento de híbridos de pimentão com potencial agronômico e resistência a PepYMV e PepYMV-Lins .....	34
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O pimentão é uma das principais culturas hortícolas do Brasil, e é acometida por uma série de patógenos. Entre as viroses que ocorrem na cultura do pimentão, o mosaico causado pela espécie *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) é considerada uma das mais importantes, tanto pelos danos que causa quanto por sua distribuição mundial.

Na natureza este vírus é transmitido por afídeos, especialmente pelas espécies *Myzus persicae* (Sulzer) e *Aphis gossypii* (Glover). O controle químico do vetor é pouco eficaz porque a dispersão do pulgão pode ser feita a longas distâncias, por exemplo, pelo vento e porque a transmissão do vírus ocorre na picada de prova. A melhor forma de controle da virose é por resistência genética.

O vírus foi inicialmente detectado no Brasil em 1950 (Costa et al., 1950) tornando-se extremamente importante na década de 1960 por falta de cultivares resistentes. Na década de 1970 a virose reduziu sua importância pela introdução de cultivares resistentes desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Nagai et al., 1968 e Nagai et al., 1972). Nos anos de 1990 a virose voltou a ser importante pela quebra da resistência genética das cultivares existentes. Em 1994 foi lançado o híbrido Magali R pela empresa Agloflora (hoje Sakata), que tornou-se o principal híbrido de pimentão comercializado no Brasil nos anos seguintes pela resistência ao novo isolado de PVY que foi denominado PVY<sup>m</sup> ou PVY-1,2 (Boiteux et al., 1996). Em 2002, este vírus foi reclassificado como *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Inoue-Nagata et al., 2002), sendo atualmente considerado o *Potyvirus* mais importante do gênero *Capsicum* no Brasil (Truta et al., 2004).

Nos anos 2000 a virose novamente reduziu sua importância pela predominância de cultivares resistentes no mercado. Ao final de 2009, foi novamente detectado um isolado de PepYMV capaz de quebrar a resistência das principais cultivares de pimentão utilizadas no Brasil. A nova estirpe foi denominada PepYMV-Lins (Gioria et al., 2009). Moura et al. (2011) analisando vinte isolados de PepYMV e PepYMV-Lins reclassificaram os mesmos em cinco diferentes estirpes evidenciando a complexidade desta espécie.

O PepYMV-Lins tem potencial de se tornar importante pela atual ausência de cultivares comerciais resistentes de pimentão. A resistência a este vírus foi descrita na cultivar Serrano Vera Cruz (Moura et al., 2011). Esta cultivar é uma pimenta do tipo

serrano e está muito distante genética e fenotipicamente do pimentão tipo cônico que é o mais plantado no Brasil.

Com a potencialidade de danos à cultura de pimentão causada pelo PepYMV-Lins, os objetivos deste trabalho foram encontrar novas fontes de resistência, estudar a herança desta(s) e fazer a introgressão em cultivares de alto potencial comercial. Espera-se assim oferecer uma alternativa para minimizar o risco de perda de produtividade das lavouras de pimentão no Brasil pelo possível aumento da disseminação e importância desta estirpe de vírus.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Pimentão

O gênero *Capsicum*, onde encontram-se as pimentas e os pimentões é um dos gêneros mais importantes de hortaliças do mundo. Segundo os dados da FAO (FAO, 2015), a área cultivada no mundo é de 3.904.349 de hectares, ocupando assim a quarta posição entre as hortaliças mais plantadas, sendo precedida pelas culturas da batata, tomate e cebola. No Brasil, está entre as dez hortaliças mais cultivadas, gerando fonte de renda e saúde para expressiva parte da população.

Os pimentões pertencem à família das Solanáceas, gênero *Capsicum* e espécie *Capsicum annuum* L. O gênero *Capsicum* foi inicialmente descrito por Tounefort (1719) e atualmente conta com 40 espécies e mais de 100 subespécies (The Plant List, 2018). Dentro deste gênero, existem diferentes graus de domesticação entre as espécies sendo classificadas como domesticadas, semidomesticadas e silvestres. Entre as domesticadas estão as espécies *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (IBPGR, 1983). O centro de origem das espécies de *Capsicum* é o continente americano (Bosland et al., 2000) com exceção de *C. anomalum*, cujo centro de origem é reportado ao Japão (Andrews, 1984). Apesar da origem concentrada no continente americano, a introdução do pimentão no Brasil só ocorreu com a chegada dos imigrantes europeus. Segundo Reifshneider (2000), não se sabe ao certo a correta data e local de início do cultivo de pimentão no Brasil, mas sabe-se que uma das primeiras cultivares plantadas no território nacional foi de origem espanhola denominada “pimentão Casca Dura”.

Moraes (2008) apontou que o início do cultivo de pimentão no Brasil começou no cinturão verde de São Paulo na cidade de Mogi das Cruzes. Goto (2016) relata que a partir da cultivar Casca Dura, os produtores japoneses iniciaram o cultivo e, por falta de sementes comerciais na época, fizeram a seleção de novas cultivares. Assim foram selecionadas as cultivares Ikeda, Avelar e Hidemasa. Nas décadas de 1980 e 1990, a cultivar Magda, desenvolvida pela empresa Agroflora, foi amplamente cultivada. Também na década de 1980, o pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Dr. Hiroshi Nagai, foi responsável pelo desenvolvimento de cultivares de pimentões denominados série Agrônomo (8,9,10,11) (Nagai, 1993), algumas delas com resistência a certas estirpes de PVY que já infectavam as lavouras brasileiras. Após forte atuação do IAC, as empresas privadas tomaram a proeminência no trabalho de melhoramento de pimentão sendo responsáveis pelo desenvolvimento das principais cultivares plantadas atualmente. Entre estas empresas destaca-se a Sakata, líder na América do Sul em pimentão para campo aberto e cultivo protegido; a Syngenta, líder mundial em pimentão para cultivo protegido e a Seminis, líder mundial em pimentão para campo aberto.

## 2.2 O mosaico causado por *Potyvirus*

O pimentão é comumente infectado por muitas espécies de vírus. Dentre estes, os que pertencem ao gênero *Potyvirus* são de grande importância na cultura (Moury et al., 2005) porque tem distribuição global (Janzac et al., 2008) e pode infectar também a cultura do tomate e da batata (Costa et al., 2003; Cunha et al., 2004) que possuem muitas áreas de cultivo em comum com o pimentão (Echer & Costa, 2002; Zambolim et al., 2004).

Várias espécies de *Potyvirus* são relatadas no mundo. As mais importantes são *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Tobacco etch mottle virus* (TEV), *Pepper venial mottle virus* (PVMV), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Caranta et al., 1997, Dogimont et al., 1996, Inue-Nagata et al., 2002). Dentre estas, apenas o *Potato virus Y* (PVY) e o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) são descritas no Brasil.

O primeiro relato de *Potyvirus* em pimentão no Brasil foi em 1950. Costa et al. (1950) descreveram o PVY infectando plantas de pimentão no Estado de São Paulo. Depois disso, várias estirpes deste *Potyvirus* foram descritas no Brasil e no mundo.

Essas estirpes receberam várias denominações ao longo do tempo como Y<sup>w</sup>, Y<sup>f</sup>, Y<sup>ft</sup> (Nagai, 1993), 0, 1, 1.2. Esta última sequência é a classificação das estirpes de *Potyvirus* mais aceita e comumente utilizada e foi feita por Gébren-Selassie e colaboradores em 1985 (Gébren-Selassie et al., 1985). Em 1986 foi identificado um isolado muito agressivo de PVY na região produtora da cidade de Elias Fausto (SP), denominado PVY<sup>m</sup>. Esse isolado foi posteriormente relatado em outras regiões brasileiras. Em 2002, com base em estudos moleculares, o PVY<sup>m</sup> foi reclassificado para *Pepper yellow mosaic virus*-PepYMV e considerada a principal espécie de *Potyvirus* no Brasil (Inoue-Nagata et al., 2002). Em 2009 foi relatada outra estirpe de PepYMV na região produtora da cidade de Lins (SP) sendo denominada de PepYMV-Lins (Gioria et al., 2009). Esta nova estirpe foi responsável pela quebra de resistência das cultivares de pimentão comercializadas à época. Moura et al. (2011) relataram a coleta de vinte diferentes isolados de PepYMV em regiões do Estado de São Paulo. Estes isolados foram classificados em cinco diferentes estirpes: 2<sup>1</sup>.2<sup>2</sup>; 2<sup>1</sup>.2<sup>3</sup>; 2<sup>1</sup>.2<sup>2</sup>.2<sup>3</sup>; 2<sup>1</sup>.2<sup>3</sup>.4 e 2<sup>1</sup>.2<sup>2</sup>.2<sup>3</sup>.4. Nesta classificação o isolado PepYMV-Lins foi reclassificado para 2<sup>1</sup>.2<sup>2</sup>.2<sup>3</sup>.

### 2.3 Resistência Genética

No Brasil, os pesquisadores vêm, ao longo dos anos, identificando e introgrido resistência genética para controlar os *Potyvirus* que acometem a cultura do pimentão. Exemplo são as cultivares desenvolvidas pelo IAC (Nagai et al., 1968; Nagai et al., 1972) e pela empresa Agroflora/Sakata.

De acordo com a estirpe do vírus prevalecente no ambiente em um determinado período de tempo, os pesquisadores vêm utilizando acessos do gênero *Capsicum* portando diferentes genes de resistência como os *pvr2*<sup>+</sup>, *pvr2*<sup>1</sup>, *pvr2*<sup>2</sup>, *pvr2*<sup>3</sup>, *pvr2*<sup>4</sup>, *Pvr4* e *Pvr7* (Gébren-Selassie et al., 1985; Arnedo et al., 1998; Charron et al., 2008). Exemplos desses acessos são o genótipo Yolo Wonder, que carrega o gene *pvr2*<sup>+</sup>, Yolo Y o gene *pvr2*<sup>1</sup>, Florida VR-2 o gene *pvr2*<sup>2</sup>, Serrano Vera Cruz o gene *pvr2*<sup>4</sup>, Puerto Rico Wonder o gene *pvr2*<sup>3</sup> e Criollo de Morellos os genes *pvr2*<sup>3</sup> e *Pvr4* (Arteaga et al., 1997; Arnedo et al., 1998; Charron et al., 2008).

O gene *Pvr4* é amplamente utilizado pelas empresas de melhoramento de hortaliças por ser monogênico, dominante e por conferir resistência a muitos isolados de PVY e PepYMV. Contudo, alguns isolados de PepYMV, como a estirpe Lins e as

estirpes 2<sup>1</sup>.2<sup>3</sup>.4 e 2<sup>1</sup>.2<sup>2</sup>.2<sup>3</sup>.4 são capazes de quebrar esta resistência. Bento et al. (2009) estudando fontes de resistências ao PepYMV encontraram dois acessos em *C. baccatum* e sete na espécie *C. chinense*, e não encontraram acessos resistentes em *C. annuum* e *C. frutescens*. Estas fontes de resistência encontradas são de difícil utilização por apresentarem herança poligênica. Moura et al. (2011) descreveram que a fonte de pimenta Serrano Vera Cruz, contendo o gene *pvr2*<sup>4</sup>, apresenta resistência para as principais estirpes de PepYMV encontradas no Brasil.

## 2.4 Duplo haploide

A técnica de duplo haploide foi inicialmente utilizada no gênero *Capsicum* para facilitar a combinação entre espécies diferentes que apresentavam restrições de cruzamento (Yoon et al., 2006). Através dessa técnica características interessantes, como resistências a patógenos e resistências a estresses abióticos, presentes em espécies selvagens de *Capsicum* que possuem restrições de cruzamento com as espécies cultivadas, puderam ser transferidas via cultura de micrósporos/anteras, criando linhas haploides e duplo haploides (Shmykova et al., 2014). Essa técnica também é utilizada pelos pesquisadores para acelerar o processo de criação de linhas homogêneas em curto espaço de tempo (Dunwell, 2010) acelerando o desenvolvimento de novas cultivares comerciais.

O passo inicial para se chegar a técnica de duplo haploide foi a aprendizagem de cultivar células vegetais *in vitro*. O primeiro relato deste tipo de cultivo foi de Haberlandt em 1902 descritos por Krikorian & Berquam (1969). Depois deste primeiro trabalho, vários outros ocorreram com o objetivo de melhorar o meio de cultivo das células e entender o que esta técnica de cultura de tecido *in vitro* poderia gerar de aplicação em várias áreas. Neste processo de aprimoramento foram descobertos os fitormônios o que gerou maior facilidade e aplicações do cultivo *in vitro* de células vegetais (Kogh et al, 1934, White et al, 1939, Van Overbeek et al., 1941).

Entre as aplicações da cultura de tecido *in vitro* no melhoramento genético de plantas podemos estão a conservação de germoplasma *in vitro*, a multiplicação de genótipos para análise em experimentos replicados (Maluf et al., 1988a; Maluf et al., 1988b), o intercâmbio de germoplasmas em condições assépticas o que facilita os serviços de quarentena e vigilância sanitária e as trocas internacionais, a obtenção de variação somaclonal (Evans & Sharp, 1986; Morrison & Evans, 1988), obtenção de

transformantes via engenharia genética (Horsch et al., 1984; Shah et al., 1986), quebra de barreira por causa da incompatibilidade genética (Gilbert & McGuire, 1952; Gilbert & McGuire, 1956), clonagem de genótipos para teste de capacidade de combinação, limpeza clonal que é hoje amplamente utilizado em batata e em alho e obtenção de duplo haploides para produção de linhas 100% homozigotas (Ferreira et al., 1994). Esta última técnica foi empregada no presente trabalho.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Localização experimental**

Todos os experimentos envolvendo a seleção de fontes de resistência (*inoculação* com os vírus), cruzamentos, produção de duplo haploide e seleção agrônômica foram realizados nos anos de 2015 a 2017. Os experimentos foram conduzidos nos setores de Melhoramento de Hortaliças e Suporte Técnico (Fitopatologia e Biotecnologia) da Estação Experimental de Bragança Paulista pertencente à empresa Sakata, entre os anos de 2015 e 2017. Ela está localizada nas coordenadas 22°57'07" S e 46°32'31", numa altitude de 850m. As temperaturas médias anuais da região giram em torno de 22°C e média de 1.400mm de pluviosidade por ano. O solo tem classificação latossolo vermelho fase argilosa com alta fertilidade.

No setor de Melhoramento de Hortaliças foram feitos os cruzamentos para obtenção das populações para estudo de herança, os cruzamentos para produção de novos híbridos e a condução das plantas resistentes obtidas a partir das inoculações com vírus. Para estes trabalhos foram utilizadas estruturas metálicas tipo arco com cobertura de filme plástico difusor e antivírus. Também foi feito neste setor a seleção dos melhores genótipos para cruzamento com a fonte de resistência encontrada e para seleção dos melhores híbridos com potencial para serem avançados para fase pré-comercial. Para este trabalho foi utilizado telado agrícola com estrutura metálica e tela de sombreamento com 70% de transparência. A utilização deste telado foi importante para evitar cruzamentos não controlados entre as linhagens elites uma vez que o pimentão é uma espécie essencialmente autógama, mas que apresenta polinização cruzada com grande facilidade em função da conformação de sua flor.

No setor de Suporte Técnico - Fitopatologia foram feitas as inoculações com os vírus. Para este trabalho foram utilizadas estruturas metálicas com cobertura e

fechamento com policarbonato onde temperatura e a umidade são controladas para permitir bom desenvolvimento das mudas.

No setor de Suporte Técnico – Biotecnologia foi feito o crescimento dos explantes oriundos das anteras em sala asséptica com luz artificial e controle de temperatura e umidade.

### **3.2 Seleção de fontes de resistência a PepYMV e PepYMV-Lins**

Foi realizada a seleção de genótipos de pimentão e pimentas com resistência ao PepYMV no banco de germoplasma da Sakata. Essa resistência foi detectada através de inoculação mecânica deste vírus realizada ao longo dos anos de trabalho de melhoramento da empresa. Este banco possuía, em outubro/2014, 22.777 acessos ativos de diferentes espécies de *Capsicum*. Deste banco de germoplasma foram selecionados 30 acessos, previamente identificados como resistentes ao PepYMV, para testes, sendo cinco de *C. baccatum*, três de *C. frutescens*, seis de *C. chinense* e dezesseis de *C. annuum*. Foram testadas várias espécies para garantir que seria encontrado ao menos um genótipo resistente aos principais isolados de Potyvirus presentes no Brasil. Foram testados genótipos sabidamente resistentes ao PepYMV com a intenção de encontrar novas fontes de resistência tanto ao PepYMV quanto ao PepYMV-Lins. Também foram testados os principais híbridos comerciais do Brasil que possuíam resistência ao PepYMV (Magali R, Dahra R, Dahra RX, Rubia R da Sakata; Supremo e Impacto da Seminis; Gaston da Syngenta; Mayara da Hortec). Os acessos selecionados do banco de germoplasma e híbridos comerciais, passaram por inoculações com isolados de vírus para buscar novas fontes de resistência ao PepYMV e PepYMV-Lins. O objetivo foi o de encontrar genótipos de pimentão com melhores qualidades agrônômicas que Serrano Vera Cruz, previamente reportado como resistente ao PepYMV-Lins, para dar continuidade aos trabalhos de criação de híbrido comercial resistente a ambas estirpes do vírus.

### **3.3 Inoculações com PepYMV e PepYMV-Lins**

As inoculações com as duas estirpes virais ocorreram em diferentes etapas do trabalho, sendo eles:

1) Fase inicial. Nesta fase realizou-se a inoculação para encontrar fontes de resistência e testar os níveis de resistência nos híbridos comerciais.

2) Fase de estudo da herança. Foram realizadas inoculações nas diferentes gerações [F1, F2, RC1 (recorrente) e RC1 (doador)] com o objetivo de avaliar a segregação e definir a herança da resistência. Foram realizadas também após a criação das linhas duplo haploides para separar as linhas resistentes das suscetíveis

3) Fase final. Para confirmação da resistência dos híbridos.

Na fase inicial, todas as 30 linhas selecionadas do banco de germoplasma e os híbridos comerciais foram inoculados com os vírus PepYMV e PepYMV-Lins (Tabela 1). As inoculações com as duas estirpes dos vírus foram feitas de forma separada para evitar sinergismo de sintoma de uma estirpe com a outra. Esses vírus foram mantidos e multiplicados nas cultivares Ikeda e Magali-R, respectivamente. A cultivar Ikeda é suscetível a ambas as estirpes do vírus e o híbrido Magali-R é resistente ao PepYMV e suscetível ao PepYMV-Lins. Para realização deste trabalho as plantas foram cultivadas dentro de estrutura metálica com cobertura de plástico difusor e antivírus e com fechamento lateral com tela de sombreamento com 50% de transparência.

**Tabela 1.** Descrição das trinta linhagens provenientes do Banco de Germoplasma da Sakata e os híbridos comerciais utilizados no trabalho de seleção e cruzamento para produção de híbridos de pimentão com resistência ao PepYMV e PepYMV-Lins.

Código/Nome	Espécie	Tipo do genótipo*
AF19053	<i>C. baccatum</i>	LBGS
AF19054	<i>C. baccatum</i>	LBGS
AF19055	<i>C. baccatum</i>	LBGS
AF19056	<i>C. chinense</i>	LBGS
AF19057	<i>C. frutescens</i>	LBGS
AF19059	<i>C. baccatum</i>	LBGS
AF19060	<i>C. frutescens</i>	LBGS
AF19061	<i>C. chinense</i>	LBGS

---

AF19062	<i>C. chinense</i>	LBGS
AF19063	<i>C. chinense</i>	LBGS
AF19064	<i>C. chinense</i>	LBGS
AF19065	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19066	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19067	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19068	<i>C. chinense</i>	LBGS
AF19069	<i>C. frutescens</i>	LBGS
AF19070	<i>C. baccatum</i>	LBGS
AF19071	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19072	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19073	<i>C.annuum</i>	LBGS
AF19074	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19075	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19076	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19077	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF19078	<i>C.annuum</i>	LBGS
AF19079	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF17200	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF17201	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF17202	<i>C. annuum</i>	LBGS
AF17203	<i>C. annuum</i>	LBGS
Dahra-R	<i>C. annuum</i>	Híbrido comercial Sakata
Dahra-RX	<i>C. annuum</i>	Híbrido comercial Sakata
Rubia-R	<i>C. annuum</i>	Híbrido comercial Sakata
Supremo	<i>C. annuum</i>	Híbrido comercial Seminis

---

Impacto	<i>C. annuum</i>	Híbrido comercial Seminis
Gaston	<i>C. annuum</i>	Híbrido comercial Syngenta
Mayara	<i>C. annuum</i>	Híbrido comercial Hortec
Ikeda	<i>C. annuum</i>	Cultivar OP
Magali-R	<i>C. annuum</i>	Híbrido comercial Sakata
Serrano Vera Cruz	<i>C. annuum</i>	Cultivar OP

LBGS – Linhas do banco de germoplasma da Sakata. OP- Polinização aberta.

Dezesseis plantas de cada genótipo foram utilizadas para inoculação com as estirpes do vírus, sendo oito inoculadas com o PepYMV e oito com o PepYMV-Lins. Foram realizadas duas inoculações, sendo a primeira realizada 25 dias após a semeadura na primeira folha definitiva e a segunda, sete dias após a primeira, na segunda folha definitiva. Os isolados virais de PepYMV e PepYMV-Lins, utilizados em todas as etapas deste trabalho, fazem parte da coleção de patógenos da Sakata. As inoculações foram feitas com extrato vegetal infectado e tamponado em fosfato de potássio 0,01M a pH 7,0. A abrasão mecânica foi feita com abrasivo (carborundum®) de 600 mesh, como descrito por Truta et al. (2004). Como testemunhas foram utilizadas as cultivares Magali R (resistente a PePYMV e suscetível a PepYMV-Lins), Ikeda (suscetível a PepYMV e PepYMV-Lins) e Serrano Vera Cruz (resistente a PepYMV e PepYMV-Lins).

A avaliação foi feita em média 15 dias após a segunda inoculação quando as testemunhas suscetíveis mostraram 100% das mudas com sintoma. As mudas foram avaliadas quanto à presença ou ausência de sintoma (mosaico e deformação) nas folhas.

### 3.4 Cruzamento das fontes de resistência com linhagens elites

As duas fontes de resistência a PepYMV e PepYMV-Lins que apresentaram melhores qualidades agronômicas em experimentos previamente conduzidos na Estação Experimental da Sakata foram cruzadas com 20 linhagens elites (linhagens com qualidade superior usadas para produção de híbridos) para obtenção de populações candidatas para criação de duplo haploides. As linhas resistentes foram

utilizadas como progenitores masculinos, enquanto que as linhas elites como progenitor feminino. Para os cruzamentos foram utilizadas dez plantas de cada genitor masculino cruzadas com quatro plantas de cada genitor feminino com emasculação de flores no mesmo dia, conforme protocolo de trabalho da empresa. Os cruzamentos foram realizados em estrutura metálicas tipo arco com cobertura de plástico difusor e antivírus e fechamento lateral com tela preta de 50%. Os híbridos oriundos destes cruzamentos foram cultivados em ambiente protegido tipo telado com estrutura metálica e cobertura e fechamento lateral com tela preta com 70% de luminosidade para evitar polinização cruzada e foram selecionados aqueles que apresentaram melhor performance agrônômica para produção de linhas homogêneas via técnica de duplo haploide e posterior criação de novos híbridos com desejada qualidade agrônômica e resistência aos PepYMV e PepYM-Lins.

### **3.5 Estudo da herança genética da resistência para PepYMV e PepYMV-Lins**

Os híbridos oriundos das duas melhores fontes de resistência para os vírus PepYMV e PepYMV-Lins foram autofecundados para criação das populações F2 ao mesmo tempo que foram retrocruzados com as fontes doadoras da resistência e com as linhagens elites para formarem as populações RC1 doador (parental doador da resistência) e RC1 recorrente (parental recorrente que apresentava ótimas características agrônômicas). Essas populações foram necessárias para as análises do teste de herança. Para cada uma das estirpes do vírus foram inoculadas 32 plantas da linhagem elite suscetível, da fonte resistente e da população F1 entre a linhagem elite suscetível e a fonte resistente. Para as populações F2 do cruzamento entre a linhagem elite e a fonte resistente, RC1 recorrente e RC1 doador, foram utilizadas 162 plantas. As inoculações com PepYMV e PepYMV-Lins seguiram o mesmo protocolo do item 3.3.

### **3.6 Coleta de anteras e produção de linhagens duplo haploides**

A produção de duplo haploide foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecido da Sakata, segundo protocolo otimizado pela empresa a partir dos estudos de Dumas de Vaultx et al. (1981). Foram coletadas anteras dos híbridos produzidos entre as duas melhores fontes de resistência a PepYMV e PepYMV-Lins com as linhas elites de

pimentão tipo cônico da Sakata. O início da coleta ocorreu logo após o aparecimento dos botões florais quando as sépalas tinham o mesmo comprimento das pétalas. Isto é importante para que a maioria dos micrósporos estejam na fase uninucleada. Após a coleta, os botões florais foram mantidos em geladeira por 24h. Na sequência foram desinfestados com água deionizada, solução de detergente 1% por 20 segundos, álcool 70% por 20 segundos, hipoclorito de sódio 2,5% (v/v de cloro ativo) por dois minutos e novamente água deionizada e autoclavada. Os explantes foram cultivados em meio de cultura até o aparecimento de embriões/plântulas. A confirmação da ploidia e da duplicação do haploide foram realizadas via citômetro.

### **3.7 Climatização das plântulas e inoculação das linhagens duplo haploides**

As plântulas produzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos foram aclimatadas em casa de vegetação com cobertura de policarbonato com temperatura, umidade e luminosidade controladas. Após a rustificação das plântulas, foi feita análise via citômetro para conferir quais mudas eram haploides e quais eram diploides. As plântulas diploides foram descartadas e as haploides foram tratadas com colchicina 0,2% para duplicação da haploidia criando assim plântulas duplo haploide com homozigose absoluta. As plântulas foram novamente avaliadas via citômetro para confirmação da transformação de haploides para duplo haploides. As mudas duplo haploides, oriundas de mudas haploides tratadas com colchicina, foram clonadas, a partir de segmentos de caule, e transplantadas para vasos plásticos contendo substrato de casca de pinus e transferidas para casa-de-vegetação para realização das inoculações com os vírus PepYMV, PepYVM-Lins para confirmação da fixação da resistência. As inoculações com as duas estirpes virais foram feitas em experimentos separados, usando as mudas clonadas para evitar sinergismo de sintoma de uma estripe para outra e seguiram o mesmo protocolo de inoculação descrito no item 3.3.

### **3.8 Seleção agrônômica das melhores linhagens**

As plântulas dos genótipos resistentes a ambas estirpes virais foram transplantadas em telados para seleção de qualidade agrônômica. Foi feito experimento comparativo com as principais testemunhas comerciais do mercado

(Dahra R, Dahra RX, Rubia R, Magali R, Mayara, Supremo, Gaston e Impacto) que também foram inoculadas e avaliadas para a resistência ao PepYMV-Lins, além das características de arquitetura de planta, formato e tamanho de frutos e potencial de produtividade. Para este experimento foram utilizadas oito plantas de cada testemunha.

### **3.9 Desenvolvimento de híbridos de pimentão com potencial agrônomico e resistência a PepYMV e PepYMV-Lins**

As linhagens duplo haploides, resistentes as viroses e com qualidade agrônômica superiores, foram cruzados entre si para obtenção de novos híbridos. Estes híbridos foram testados utilizando como padrões os híbridos comerciais de melhores qualidades agrônômicas do mercado (item 3.8 e Tabela 1). Os híbridos experimentais com superioridade agrônômica e resistência ao PepYMV e ao PepYMV-Lins foram determinados como candidatos para se tornarem comerciais atendendo assim o objetivo de fornecer ao mercado brasileiro uma cultivar com múltipla resistência a PepYMV e PepYMV-Lins. Esses híbridos foram indexados novamente com ambos os vírus para confirmação da resistência, seguido o mesmo protocolo de inoculação descrito no item 3.3.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Seleção de fontes de resistência a PepYMV e PepYMV-Lins**

As testemunhas comerciais incluídas no experimento para seleção de genótipos com resistência ao PepYMV e PepYMV-Lins, reagiram de acordo com o esperado. Todos os híbridos comerciais foram resistentes ao PepYMV mas suscetíveis ao PepYMV-Lins. Dos trinta genótipos previamente selecionados no banco de germoplasma da Sakata por serem resistentes ao PepYMV e por apresentarem divergência genética (linhas geneticamente distintas entre si) foram detectadas seis pimentas (AF19057, AF19059, AF19060, AF19061, AF19062 e o AF19064) e duas linhagens de pimentões da espécie *C. annuum* (AF17200 e AF17201) que mostram-se resistentes também ao PepYMV-Lins (Tabela 2). Esses dois acessos de pimentões, que são do tipo cônico, também apresentaram qualidade

agronômica de planta, de fruto e de produção próxima aos híbridos comerciais. Como um dos objetivos do trabalho era de avançar rápido no melhoramento para criação de novos híbridos comerciais resistentes as duas estirpes, foram utilizados apenas estes dois últimos genótipos resistentes para cruzamento com linhagens elites, estudo de herança, criação de duplo haploides e criação de novos híbridos com potencial comercial.

Tabela 2. Reação dos genótipos de *Capsicum* para os isolados dos vírus PepYMV e PepYMV-Lins

Código/Nome	Espécie	PepYMV	PepYMV-Lins
AF19053	<i>C. baccatum</i>	R	S
AF19054	<i>C. baccatum</i>	R	S
AF19055	<i>C. baccatum</i>	R	S
AF19056	<i>C. chinense</i>	R	S
AF19057	<i>C. frutescens</i>	R	R
AF19059	<i>C. baccatum</i>	R	R
AF19060	<i>C. frutescens</i>	R	R
AF19061	<i>C. chinense</i>	R	R
AF19062	<i>C. chinense</i>	R	R
AF19063	<i>C. chinense</i>	R	S
AF19064	<i>C. chinense</i>	R	R
AF19065	<i>C. annuum</i>	R	S
AF19066	<i>C. annuum</i>	R	S
AF19067	<i>C. annuum</i>	R	S
AF19068	<i>C. chinense</i>	R	S
AF19069	<i>C. frutescens</i>	R	S
AF19070	<i>C. baccatum</i>	R	S
AF19071	<i>C. annuum</i>	R	S

---

AF19072	<i>C. annuum</i>	R	S
AF19073	<i>C.annuum</i>	R	S
AF19074	<i>C. annuum</i>	R	S
AF19075	<i>C. annuum</i>	R	S
AF19076	<i>C. annuum</i>	R	S
AF19077	<i>C. annuum</i>	R	S
AF19078	<i>C.annuum</i>	R	S
AF19079	<i>C. annuum</i>	R	S
AF17200	<i>C. annuum</i>	R	R
AF17201	<i>C. annuum</i>	R	R
AF17202	<i>C. annuum</i>	R	S
AF17203	<i>C. annuum</i>	R	S
Dahra-R	<i>C. annuum</i>	R	S
Dahra-RX	<i>C. annuum</i>	R	S
Rubia-R	<i>C. annuum</i>	R	S
Supremo	<i>C. annuum</i>	R	S
Impacto	<i>C. annuum</i>	R	S
Gaston	<i>C. annuum</i>	R	S
Mayara	<i>C. annuum</i>	R	S
Ikeda	<i>C. annuum</i>	S	S
Magali-R	<i>C. annuum</i>	R	S
Serrano Vera Cruz	<i>C. annuum</i>	R	R

---

## **4.2 Cruzamento das fontes de resistência com linhagens elites**

As linhagens de pimentões AF17200 e AF17201 cruzadas com as vinte linhas elites da empresa produziram 40 híbridos F1. Destes, após análise de características agronômicas foram selecionados os dez que apresentaram as melhores performances em termos de padrão de planta, tamanho e formato de frutos e produtividade. Os dez híbridos foram autofecundados para geração F2 e seus respectivos retrocruzamentos (doador e recorrente).

## **4.3 Estudo da herança genética da resistência para PepYMV e PepYMV-Lins**

Os dez híbridos obtidos entre os cruzamentos das duas fontes de resistência aos vírus e as linhas elites, bem como a geração F2 de cada híbrido e o retrocruzamento para fonte de resistência e para as linhas elites (RC1 para o doador e RC1 para o recorrente) foram submetidas a inoculação para os dois vírus. As testemunhas utilizadas no ensaio comportaram-se como o esperado. Ikeda foi suscetível a ambos os vírus; Magali R foi resistente ao PepYMV mas suscetível ao PepMY-Lins e Serrano Vera Cruz foi resistente a ambos os vírus. Os dez híbridos F1 foram suscetíveis ao PepYMV-Lins, a geração F2 destes híbridos apresentaram segregação de três plantas suscetíveis ao PepYMV-Lins para uma planta resistente (Figura 1). Os retrocruzamentos dos híbridos para a fonte de resistência apresentaram segregação de uma planta resistente para o PepYMV-Lins para uma planta suscetível e os retrocruzamentos dos híbridos para as linhas elites mostraram que todas as plantas foram suscetíveis. Foi constatado também que toda planta resistente ao PepYMV-Lins também era resistente ao PepYMV. Com estes padrões de segregações fica evidenciado que a herança para o PepYMV-Lins é monogênica e recessiva sendo obrigado o cruzamento de duas linhas resistentes para desenvolvimento de híbridos resistentes.



Figura 1. Segregação de plantas resistentes e suscetíveis da população F2 do cruzamento entre linhas elites e fontes de resistência ao PepYMV-Lins.

#### **4.4 Produção de linhagens duplo haploides e seleção da resistência conjunta ao PepYMV e PepYMV-Lins**

Dos botões florais coletados a partir dos dez híbridos selecionados nos ensaios de resistência e performance agrônômica, cinco foram regenerados, gerando novas linhagens. Análises por citrômetro confirmaram a haploidia. Após a aplicação de colchicina o material genômico foi novamente duplicado, produzindo plantas duplo haploides, com o máximo de homozigose possível.

Os clones das cinco plantas aclimatadas foram submetidos a inoculação dos dois vírus de forma individualizados e foram resistentes tanto ao PepYMV quanto ao PepYMV-Lins.

#### 4.5 Desenvolvimento de híbridos de pimentão com potencial agrônômico e resistência a PepYMV e PepYMV-Lins

A partir do cruzamento entre si das cinco linhas duplo haploides foram produzidos 20 híbridos F1. Todos eles foram resistentes aos vírus PepYMV e PepYMV-Lins. Dois híbridos experimentais, sendo eles os AF23571 e AF23579 (Figura 2), que apresentaram superioridade em relação as testemunhas comerciais foram avançados para o estágio pré-comercial na empresa Sakata. Estão em andamento testes externos em regiões produtoras de pimentão a campo aberto no Brasil para comprovação da superioridade agrônômica e para posterior avanço para comercial.



Figura 2. Da esquerda para direita: Híbrido Magali-R padrão de mercado, híbridos AF23571 e AF23579 mostrando superioridade em produção e qualidade de frutos, além de resistência a PepYMV e PepYMV-Lins.

## 5 DISCUSSÃO

A resistência genética, quando possível de se utilizar, é a alternativa mais eficaz e econômica contra patógenos que prejudicam a produção de plantas. Gera redução de custos, faz com que a produção seja mais fácil, gera menor uso de defensivos o que acarreta menor contaminação do ambiente, do produtor e do consumidor. No caso estudado, foi possível encontrar e incorporar rapidamente a resistência genética a PepYMV e PepYMV-Lins em híbridos com alto potencial agrônomico e produtivo.

A rápida incorporação da resistência em linhagens elites e a posterior criação de híbridos com potencial de comercialização foi possível porque a herança genética da resistência era simples e também pelo uso da técnica do duplo haploide.

A técnica de produção de linhas a partir de duplo haploide não é considerada nova, mas sua utilização no Brasil para produção de híbridos melhorados de hortaliças é relativamente recente e pouco explorada. O uso desta técnica permite introduzir mais rapidamente um gene de interesse em híbridos comerciais, reduzir os custos do melhoramento, promover soluções mais rápidas aos produtores e antecipar as receitas por parte das empresas que fazem melhoramento genético. Utilizando a técnica convencional de incorporação de genes de interesse para as linhas elites seria preciso percorrer oito ciclos de seleção, incluindo cinco retrocruzamentos para retornar a 98% de similaridade a linhagem elite e mais ciclos de seleção e inoculação com o vírus e de seleção agrônomico para estabilização da nova linhagem elite criada. Neste trabalho, a incorporação da resistência em linhagens elites, feita a partir da utilização da técnica de duplo haploide, reduziu significativamente o tempo para obtenção da linhagem melhorada. Foram necessários apenas dois ciclos para a geração das linhas, que incluiu o cruzamento das fontes de resistência com as linhas elites e o crescimento das linhas após a duplicação do seu genótipo. Além de acelerar o processo de melhoramento genético, esta técnica consegue gerar linhas puras o que não seria possível utilizando o melhoramento convencional. Assim fica evidenciado a importância de incorporação de novas técnicas e ferramentas biotecnológicas no melhoramento convencional, reduzindo custos e acelerando os resultados.

A resistência genética aos vírus PepYMV e PepYMV-Lins encontrada nas duas linhagens de *C. annuum*, conforme estudo de herança realizado, é controlado por um gene monogênico e recessivo. Por possuir caráter monogênico, torna o trabalho de

melhoramento genético e incorporação da resistência mais fácil. Contudo por ter expressão recessiva, o gene requer que seja incorporado em ambas as linhas para produção de híbrido resistente. Possivelmente o gene presente nas linhas de *C. annuum*, usadas neste trabalho como fontes de resistência seja o *pvr2*<sup>4</sup>. Para melhor elucidação da resistência presente nos híbridos pré-comerciais AF23571 e AF23579 tornam-se necessários testes com marcadores moleculares para verificar se essa resistência é conferida por um dos nove alelos descritos do gene *pvr* ou ainda se trata de um novo alelo/ gene.

Os híbridos atualmente comercializados no Brasil são resistentes apenas ao PepYMV (anteriormente denominado PVY Ym ou PVY 1-2). Este vírus está presente em todo território brasileiro. O uso conjunto de trabalhos envolvendo técnicas de melhoramento genético, de fitopatologia e de cultura de tecido foram suficientes e adequadas para disponibilizar ao mercado nacional híbridos com resistência ao PepYMV e ao PepYMV-Lins (hoje denominado estirpe 2<sup>1.2<sup>2</sup>.2<sup>3</sup></sup>). Esta última estirpe está presente em apenas algumas regiões brasileiras de produção de pimentas e pimentões, mas tem alto potencial de se disseminar por possuir, assim como o PVY e o PepYMV, grande gama de plantas hospedeiras (Truta et al., 2003), além de inseto vetor altamente eficiente na transmissão. Também tem potencial para se tornar importante doença da cultura, uma vez que não há no mercado nacional híbridos comerciais com resistência. Os experimentos de desenvolvimento e confirmação de performance dos híbridos AF23571 e AF23579 nas regiões Sul, Sudeste, Centro Oeste e Nordeste do Brasil foram satisfatórios para a resistência, não sendo encontrada nenhuma planta com sintoma de *Potyvirus*. Isto mostra a grande estabilidade da resistência das fontes encontradas e dos híbridos criados com uso destas fontes. Novos trabalhos de inoculação e seleção com as demais estirpes de *Potyvirus* já relatados no Brasil (2<sup>1.2<sup>2</sup></sup>; 2<sup>1.2<sup>3</sup></sup>; 2<sup>1.2<sup>2</sup>.2<sup>3</sup></sup>; 2<sup>1.2<sup>3</sup>.4</sup>; 2<sup>1.2<sup>2</sup>.2<sup>3</sup>.4</sup>) precisam ser feitos para confirmar a estabilidade da resistência desses híbridos, bem como o acompanhamento da expressão da resistência nos campos de cultivo em diferentes regiões do Brasil quando os híbridos criados tornarem-se comerciais.

O presente trabalho disponibiliza ao mercado nacional dois híbridos em estágio pré-comercial com resistência aos vírus PepYMV e PepYMV-Lins o que gera maior estabilidade de resistência a *Potyvirus* para os produtores.

Novos trabalhos devem ser feitos para melhorar a compreensão da genética de resistência a *Potyvirus* em pimentão assim como melhor compreensão e

classificação das estirpes deste vírus presentes no território nacional como forma a gerar conhecimento sobre este complexo patógeno/hospedeiro facilitando o trabalho de incorporação de resistência genética garantindo assim maior eficácia e economia na produção nacional de pimentão.

## **6 CONCLUSÃO**

O presente trabalho encontrou fontes homozigotas recessivas que promoveram resistência múltipla em pimentão ao PepYMV e PepYMV-Lins. Por meio de diferentes técnicas de melhoramento genético, de fitopatologia e de cultura de tecido, o presente trabalho produziu dois híbridos pré-comerciais de pimentão (AF23571 e AF23579) com padrão agrônômico adequado e estabilidade de resistência, o que pode dar maior segurança e facilitar a produção de pimentão no território nacional.

**REFERÊNCIAS**

ANDREWS, J. **Peppers**: The domestication Capsicum. University of Texas Press. USA, 1984. 170p.

ARNEDO, A. A. M.; ARTEAGA, L. M.; ORTEGA, R. Response of Serrano Criollo de Morelos-334 to PVY pathotypes. **Capsicum and Eggplant Newsletter**; p.105-109, 1998.

ARTEAGA, L.M., ANDRES, A.M., ORTEGA, G.R. New Potato virus Y pathotype in pepper. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v.16, p.85-86, 1997.

BENTO, C. S.; RODRIGUES, R.; ZERBINI JÚNIOR, F. M.; SUDRÉ, C. P. Sources of resistance against the *Pepper yellow mosaic virus* in chili pepper. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.196-201, 2009.

BOITEUX, L. S.; CUPERTINO, F. P.; SILVA, C.; DUSI, A. N.; MONTE-NESICH, D. C.; VAN DER VLUGT. R. A. A. Resistance to *Potato virus Y* (pathotype 1-2) in *Capsicum annuum* and *Capsicum chinense* is controlled by two independent major genes. **Euphytica**, v.87, p.53-58, 1996.

BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E.J. **Pepper: vegetable and spice capsicums**. CABI Publishing, Wallingford, 2000. 204p.

CARANTA, C., LEFEBVRE, V., PALLOIX, A. Polygenic resistance of pepper to potyvirus consist of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, n.10, p. 872-978, 1997.

CHARRON, C. Natural variation and functional analysis provide evidence for coevolution between plant Eif4e and potyviral VPg. **The Plant Journal**, v.54, p.56-68, 2008.

COSTA, A.S.; ALVES, S. Mosaico do pimentão. **Bragantia**. Campinas, v.10, p.95-96, 1950.

COSTA, H.; VENTURA, J. A.; ZAMBOLIN, E. M.; BASTOS, J. V. B.; CLIMAN, L. Distribuição do *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.247-248, 2003.

CUNHA, L. C. V.; RESENDE, R. O.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A. K. Distinct features of *Pepper yellow mosaic virus* isolates from tomato and sweet pepper. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.663-667, 2004.

DOGIMONT, C., PALLOIX, A.; DAUBZE, A.M., MARCHOUX, G., BEBRE-SELASSIE, K., POCHARD, E. Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyvirus using double haploid lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Euphytica**, v.88, p.231-239, 1996.

DUMAS DE VAULX R., CHAMBONNET D., POCHARD E. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.) amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements á +35 °C. **Agronomie**, v.1, p.859-864, 1981.

DUNWELL, J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 377–424, 2010.

ECHER, M. M.; COSTA, C. P. Reaction of sweet pepper to the Potato virus Y (PVY<sup>M</sup>). **Scientia Agricola**, v.59, p.309-314, 2002.

EVANS, D.A.; FLICK, C.E.; JENSEN, R.A. Disease resistance: incorporation in sexually incompatible somatic hybrids of the genus *Nicotiana*. **Science**, v.213, p.907-909, 1981.

EVANS, D.A., SHARP, W.R. Applications of somaclonal variation. **Bio/Tech**, v.4, p.528-532, 1986.

FAO 2015. **Statistic division**. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/ess/en/>, Acesso em: 29 de set. 2018.

FERREIRA, M.E.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T.C. RFLP mapping of *Brassica napus* using double haploid lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.615-621, 1994.

GÉBRE-SELASSIE, K.; MARCHOUX, G.; DELECOLLE, B.; POCHARD, E. Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du Sud-Est de la France. Caractérisation et classification en pothotypes. **Agronomie**, v.5, p.621-630, 1985.

GILBERT, J.; McGUIRE, D.C. Root knot resistance in commercial type tomatoes in Hawaii. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.60, p.401-411, 1952.

GILBERT, J.; McGUIRE, D.C. Inheritance of resistance to severe root knot form *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.68, p.437-442, 1956.

GIORIA, R.; BRAGA, R. S.; KRAUSE-SAKATE, R.; ROULLIER, C.; ROSA, D.D.; MOURA, M.F.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SAWAZAKI, H.E.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. et al. Breakdown of resistance in sweet pepper against *Pepper yellow mosaic virus* in Brazil. **Scientia Agricola**, v.66, p.267-269, 2009.

GOTO, R. A Cultura. In Nick, Carlos; Borém, Al. (Eds). **Pimentão do plantio à colheita**. Ed. UFV, Viçosa, 2016, p.9-16.

HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v.227, p.1229-1231, 1984.

IBPGR. **Genetic resource of Capsicum** – a global Plant of action. Secretariat IBPGR, Rome. 1983

INOUE-NAGATA, A. K.; FONSECA, M. E. N.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L. S.; MONTE, D. C.; DUSI, A. N.; ÁVILA, A. C.; VLUGT, R. A. A. VAN DER. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweet pepper, *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**, v.147, p.849-855, 2002.

JANZAC, B.; FABRE, M. F.; PALLOIX, A.; MOURY, B. Characterization of a new potyvirus infecting pepper crops on Ecuador. **Archives of Virology**, v.153, p.1543-1548, 2008.

KOGH, F.; HAAGEN-SMIT, A.J.; ERXLEBEN, H. Über ein neues auxin (‘Hetero-auxin’) aus harn. **Zeitschrift fuer Physiologische chemie**, v.228, p.90-103, 1934.

KRIKORIAN, A.D.; BERQUAM, D.L. Plant cell and tissue culture: the role of haberlandt. **Botanical Review**, v.35, p.59-88, 1969.

MALUF, W.R.; CALDAS, L.S.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D.; IKUTA, H.; KUNIEDA-YABASE, M. Alternatives to current tropical cauliflower hybrids obtained from self-incompatible inbred lines. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.12, n.2, p.331-345, 1988a.

MALUF, W.R.; CORTE, R.D.; TOMA-BRAGHINI, M.; CALDAS, L.S.; IKUTA, H.; KUNIEDA-YABASE, M. Early testing of parental combining ability in tropical cauliflower hybrids. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.11, n.4, p.893-903, 1988b.

MORAES, M. S. História da imigração japonesa em Mogi das Cruzes. Mogi News, Mogi das Cruzes, 2008. 276 p.

MORRISON, R.A.; EVANS, D.A. **Bells sweet**: plant variety protection certificate N° 9700124. 1988.

MOURA, M. F., MITUTI, T., MARUBAYASHI, J. M., GIORIA, R., KOBORI, R. F., PAVAN, M. A., SILVA, N., SAKATE, R. K. A classification of *Pepper yellow mosaic*

*virus* isolates into pathotypes. **European Journal Plant Pathology**. v.131, p.549-552, 2011.

MOURY, B.; PALLOIX, A.; CARANTA, C.; GOGNALONS, P.; SOUCHE, S.; GÉBRE-SELASSIE, K. Serological, molecular and pathotype diversity of *Pepper vein mottle virus* and *Chili vein mottle virus*. **Phytopathology**, v.95, p.227-232, 2005.

NAGAI, H. Pimentão, pimento doce e pimenta In: FURLANI, A.M.C; VIEGAS, G.(Orgs). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo**. Instituto Agrônomo, Campinas, 1993. p.276-294.

NAGAI, H.; COSTA, A.S. Four new pepper varieties resistant to vírus Y in Brazil. **Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum**, p.283-287, 1972.

NAGAI, H.; SMITH, P. G. Reaction of pepper varieties to naturally occurring viruses in California. **Plant Disease Reporter**, v.52, p.928-930, 1968.

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

SHAH, D.M.; HORSCH, R.; KLEE, H.J; KISHORE, G.M.; WINTER, J.A.; TUMER, N.E.; HIRONAKA, C.M.; SANDERS, P.R.; GASSER, C.S.; AYKENT, S.; SIEGEL, N.R.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. **Science**, v.236, p.478-481, 1986.

SHMYKOVA, N. A.; PYSHNAYA, O. N.; SHUMILINA, D. V.; DZHOS, E. A. Morphological characteristics of double haploid plants of pepper produced using microspore/anther in vitro culture of the interspecies hybrids of *Capsicum annuum* L. and *C. chinense* Jacq. **Russian Agricultural Sciences**, v.40, p. 21-25, 2014.

THE PLANT LIST. Disponível em:<http://www.theplantlist.org/browse/A/Solanaceae/Capsicum>>, Acesso em: 29 de set. 2018.

TOUNEFORT, J.P. **Institutiones Rei Herbarie**. Typografia Regia, Paris. 1719. 124p.

TRUTA, A.A.C., Souza, A.R.R., Nascimento, A.V.S., Pereira, R.C.,Pinto, C.M.F., Brommonschenkel, S.H., Carvalho, M.G., Zerbini, M. Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.160-168, 2004.

VAN OVERBEEK, J., CONKLIN, M.E., BLAKESLEE, A.F. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. **Science**, v.94, p.305-351, 1941.

YOON, B.J.; JANG, C.D.; DO, J.W.; AND PARK, G.H. Over coming two postfertilisation genetic barriers in interspecific hybridization of anthracnose resistance. *Breeding Science*, v. 56, p.31–38, 2006.

WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. **American Journal of Botany**, v.26, p.59-64, 1939.

ZAMBOLIM, E. M.; COSTA, H.; CAPUCHO, A. S.; AVILA, A. C.; INOUE-NAGATA, A. K.; KITAJIMA, E. W. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região Serrana do Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.325-327, 2004.