



**JÉSSICA FIGUEIREDO REZENDE**

**NOVO GENE DE RESISTÊNCIA AO PepYMV  
EM *Capsicum annuum* L.**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**JÉSSICA FIGUEIREDO REZENDE**

**NOVO GENE DE RESISTÊNCIA AO PepYMV EM *Capsicum annuum* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Wilson Roberto Maluf

**LAVRAS – MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rezende, Jéssica Figueiredo.

Novo gene de resistência ao PepYMV em *Capsicum annuum*  
L./ Jéssica Figueiredo Rezende. – Lavras : UFLA, 2015.  
58 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador: Wilson Roberto Maluf.

Bibliografia.

1. *Capsicum annuum* 2. PepYMV 3. Resistência. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**JÉSSICA FIGUEIREDO REZENDE**

**NOVO GENE DE RESISTÊNCIA AO PepYMV EM *Capsicum annuum* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de julho de 2015.

Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes      UFLA

Dr. Sebastião Márcio de Azevedo      SAKATA

Dr. Wilson Roberto Maluf  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Aos meus pais Consuelo e Márcio, e a minha irmã Franciene, por todo amor e apoio.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar força nos momentos difíceis, sempre mostrando o melhor caminho.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim, e muitas vezes privaram do próprio conforto para que eu tivesse um futuro melhor. Pelo amor incondicional e pelos sábios conselhos.

À minha irmã, minha amiga, por sempre estar ao meu lado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela boa formação e oportunidade de poder realizar o curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à empresa HortiAgro Sementes S.A e à Financiadora de Estudos e Projetos/Ministério de Ciência e Tecnologia (FINEP/MCT), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor e orientador Dr. Wilson Roberto Maluf pela confiança, incentivo, ensinamentos transmitidos e exemplo de profissionalismo.

Ao Dr. Sebastião Márcio de Azevedo, membro da banca examinadora, pela disponibilidade e por contribuir de forma decisiva para a qualidade desta dissertação.

Ao Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes que, além de participar da banca examinadora, sempre esteve disponível para aconselhar, desde os tempos da graduação. Pela amizade e exemplo de profissionalismo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos transmitidos, dedicação e agradável convivência.

Aos técnicos Paulo Moretto e Vicente Licursi, pelo apoio e grande amizade.

Aos funcionários da HortiAgro Sementes S.A., pela grande ajuda.

Ao técnico Lamartine, pela amizade e pela disponibilidade para me auxiliar no laboratório.

Ao meu cunhado, Cleiton, pela amizade e conselhos.

Aos colegas de trabalho, Monik, Douglas, Cyntia, Alex, João, Marcela, Alisson, Natália, Régis, Tiago, Betsabé, Beatriz, Rodolfo, Rafaela, Marina, Carla, Jéssica Nogueira, Carlos, Carol, Danilo, Guilherme, Irã e Daniela.

A todos os colegas de pós-graduação, pela amizade e boa convivência, em especial aos meus amigos: Isabella, Rafael Chagas, Indalécio, Márcia, Rafael Nalin, Larissa, Carlos Henrique, Ana Izabela, Juliana, Vitor, Mário, Guilherme, Rafael Diniz e Mariana.

Às secretárias Lilian, Rafaela e Zélia, e às funcionárias Dona Ironдина, Du e Thaís, pelo auxílio e amizade.

A todos aqueles que não foram aqui citados e de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

## RESUMO GERAL

A existência de variabilidade genética no gênero *Capsicum* tem permitido controlar com eficiência as doenças causadas pelo complexo potyvirus, que podem ser controladas por pelo menos um dos locos gênicos da série *pvr* descritos na literatura. Desses, apenas *Pvr4* e *Pvr7* têm herança monogênica dominante e localizam-se no cromossomo 10 do pimentão a 2 cM de distância um do outro. O loco *Pvr4* está associado a um marcador tipo CAPS codominante, cuja banda de 444 pb é associada ao alelo de resistência e a banda de 458 pb ao alelo de suscetibilidade. O objetivo deste trabalho foi determinar se a resistência ao *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), encontrada em genótipos de pimentão não associados ao marcador *Pvr4* é alélica ao mesmo. As avaliações da resistência dos genótipos ao PepYMV foram realizadas em casa de vegetação na área experimental da empresa HortiAgro Sementes SA e os trabalhos de laboratório foram realizados na Universidade Federal de Lavras. Foram utilizados os genótipos: Myr-29-10 (P1) resistente ao PepYMV e portador do alelo de resistência *Pvr4* (associado à banda de 444 pb); PIM-025 (P2) resistente ao PepYMV (com padrão de banda 458 pb); F1 (P1 x P2) (com duas bandas, uma de 444 pb e outra de 458 pb); F2 (P1 x P2); RC1(P1)={[F1 (P1 x P2)] x P1}; RC1(P2)={[F1 (P1 x P2)] x P2}; Magali-R; Konan-R; Mallorca; Criollo de Morelos 'CM- 334-UFV'; Criollo de Morelos 'CM-334-INRA'; PIM-HE-133; PIM-013 e Ikeda. Através da segregação na geração F2, foi possível inferir que a resistência de genótipos não associados a este marcador e que apresentam padrão de banda  $Pvr4^+/Pvr4^+$  é devida a um gene diferente daqueles descritos na literatura até o presente momento.

Palavras-chave: *Capsicum annuum*. Potyvirus. PepYMV. Resistência. *Pvr*.



## GENERAL ABSTRACT

Genetic variability in *Capsicum* has been exploited to control virus plant diseases caused by potyvirus complex, which can be imparted by at least one of the *pvr* genes described in literature. Among these described genes, only *Pvr4* and *Pvr7*, both closely linked on *Capsicum* chromosome 10, have dominant monogenic inheritance. The *Pvr4* gene is linked to a codominant marker, for which the resistant allele is associated to the 444 pb band pattern and the susceptible allele is associated to the 458 pb band pattern. The objective of this research was to determine if the resistance found in pepper genotypes, and which are not associated to the CAPS marker *Pvr4*, is allelic to this gene. Genotypes resistance to PepYMV were evaluated in a greenhouse at HortiAgro Sementes SA, located in Ijaci, Minas Gerais, Brazil. Genotyping was done in the Molecular Genetics Lab, of the Biology Department at the Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. The genotypes used in this trial were the following: Myr-29-10, carrying *Pvr4* gene (P1 with a band pattern of 444 pb); PIM-025 (P2 with a band pattern of 458 pb); F1 (P1 x P2); F2 (P1 x P2); BC1(P1) = {[F1 (P1 x P2)] x P1}; BC1(P2) = {[F1 (P1 x P2)] x P2}; Magali-R; Konan-R; Mallorca; Criollo de Morelos 'CM-334-UFV'; Criollo de Morelos 'CM-334-INRA'; PIM-HE-133; PIM-013 and Ikeda. From the F2 generation and its segregation, the results indicated that the resistance found in the genotype PIM-025 is not associated with the *Pvr4* marker, and the presence of band pattern *Pvr4*<sup>+</sup>/*Pvr4*<sup>+</sup> is due a different gene from those described in the literature so far.

Keywords: *Capsicum annuum*. Potyvirus. PepYMV. Resistance. *Pvr*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Figura 1 - Padrão eletroforético de fragmentos de DNA amplificados para o marcador CAPS em plantas de pimentão. ....	45
Quadro 1 Número de parcelas e total de plantas de cada tratamento utilizado no experimento em questão. ....	38
Quadro 2 Escala descritiva de notas para avaliação da severidade do PepYMV em plantas de pimentão. ....	40

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

- Tabela 1 - Análise da segregação da resistência ao PepYMV obtidas através da avaliação das populações experimentais P1 (Myr-29-10), P2 (PIM-025), F1 (P1 X P2 ), F2 (P1 X P2 ), F1 x P1 e F1 x P2; e das testemunhas Ikeda, PIM-013, CM-334-INRA, CM-334-UFV, PIM-HE-133, Konan-R, Magali-R e Mallorca.....44
- Tabela 2 - Caracterização dos genótipos utilizados no experimento quanto à reação ao PepYMV e ao padrão de banda apresentado para o marcador *Pvr4*.....45
- Tabela 3 - Proporção observada de amostras associadas ao marcador *Pvr4* nas populações experimentais Myr-29-10 (P1), PIM-025 (P2), F1 (P1 X P2), F1 x P1, F1 x P2, Ikeda, PIM-013, CM-334-INRA, CM-334-UFV, PIM-HE-133, Konan-R, Magali-R e Mallorca. ....47
- Tabela 4 - Dados da genotipagem realizada através da utilização do marcador *Pvr4*, referentes à reação de plantas da geração F2 ao PepYMV.....50

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> ..... 15
<b>2.1</b>	<b>A cultura do pimentão</b> ..... 15
<b>2.2</b>	<b>Melhoramento genético de pimentão</b> ..... 16
<b>2.3</b>	<b>Potyviroses</b> ..... 18
<b>2.4</b>	<b>Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)</b> ..... 19
<b>2.5</b>	<b>Melhoramento genético visando resistência ao PepYMV</b> ..... 20
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> ..... 24
	<b>REFERÊNCIAS</b> ..... 25
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> ..... 29
	<b>ARTIGO 1 Resistência genética de genótipos de pimentão</b>
	<b>ao PepYMV (<i>Pepper Yellow Mosaic Virus</i>)</b> ..... 29

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) causador do mosaico amarelo do pimentão tem ocorrência natural na maioria das regiões produtoras de pimentão do Brasil e causa grandes perdas na cultura, caracterizando-se como um entrave ao aumento da produção (NOGUEIRA et al., 2012).

A principal forma de controle do PepYMV é a resistência genética (BENTO et al., 2013), que apresenta vantagens econômicas e ecológicas (GONÇALVES et al., 2013; REVERS; NICAISE, 2014).

A existência de variabilidade genética no gênero *Capsicum* tem permitido controlar com eficiência, via resistência genética, as doenças viróticas causadas pelo complexo potyvirus. Fontes de resistência têm-se mostrado eficientes e duradouras em condições de inoculação artificial e em nível de campo (CARANTA; THABUIS; PALLOIX, 1999; ECHER; COSTA, 2002; NOGUEIRA et al., 2012).

A resistência às potyvirose no pimentão pode ser controlada por pelo menos um dos locos gênicos da série *pvr*, os quais os autores denominaram: *pvr1*; *pvr2*; *pvr3*; *Pvr4*; *pvr5*; *pvr6* e *Pvr7* (CARANTA; THABUIS; PALLOIX, 1999; GRUBE; RADWANSKI; JAHN, 2000; NOGUEIRA et al., 2012; PARRELLA et al., 2002). Com exceção do alelo *pvr3*, todos os demais alelos da série *pvr* estão associados a um ou mais marcadores moleculares (CARANTA; THABUIS; PALLOIX, 1999).

Em *Capsicum annuum* L. “Serrano Criollo de Morelos-334”, foi identificado mais um gene cuja herança é monogênica e recessiva, o qual foi denominado *pvr8* (ARNEDO-ANDRÉS; LUIS-ARTEAGA; GIL-ORTEGA,

2006), de acordo com a nomenclatura proposta por Kyle e Palloix (1997). Em um estudo recente foi identificado um outro gene de resistência ao *Pepper mottle virus* (PepMoV), uma espécie de potyvirus, em *Capsicum annuum* cv. Floral Gem (EUA), localizado no cromossomo 6, o qual foi denominado *Pvr9* (TRAN et al., 2015).

*Pvr4* e *Pvr7* têm herança monogênica dominante e conferem resistência a todos os patótipos das espécies conhecidas e testadas (ARNEDO-ANDRÉS et al., 2002; CARANTA; THABUIS; PALLOIX, 1999; NOGUEIRA et al., 2012). Os locos *Pvr4* e *Pvr7* foram ambos mapeados no cromossomo 10 do pimentão, entretanto são oriundos de espécies diferentes (GRUBE et al., 2000).

No Brasil, várias fontes de resistência de amplo espectro à estirpe comum de PVY e a PepYMV têm sido identificadas, entre elas as resistências encontradas no acesso CM-334 e em algumas linhagens e híbridos comerciais, e nas cultivares de polinização aberta Myr-29 e Myr-10 (ECHER; COSTA, 2002). O acesso CM-334-UFV ('Criollo de Morelos-334', proveniente da Universidade Federal de Viçosa) distingue-se do CM-334-INRA ('Criollo de Morelos-334', proveniente do Institut National de La Recherche Agronomique); embora ambos os acessos sejam resistentes ao PepYMV, apenas em CM-334-INRA a resistência foi associada à banda de 444 pb (*Pvr4/Pvr4*). É possível que, no acesso CM-334-UFV, o alelo *Pvr4* não esteja associado à banda de 444 pb ou mesmo que sua resistência ao PepYMV seja controlada por outro gene que não o *Pvr4* (NOGUEIRA et al., 2012).

O genótipo Myr-29-10 é resistente ao PepYMV e está associado ao mesmo marcador tipo CAPS codominante presente em CM-334-INRA, que está a  $2,1 \pm 0,8$  cM do alelo *Pvr4* e gera bandas de 458pb nos genótipos suscetíveis (*Pvr4<sup>+</sup>/Pvr4<sup>+</sup>*) e 444 pb nos resistentes (*Pvr4/Pvr4*). A linhagem PIM-025 não apresenta a banda de 444 pb, associada ao alelo *Pvr4*, embora seja resistente ao PepYMV. É possível que esta resistência seja originária do acesso CM-334-

UFV, e não do 'CM-334' de Caranta, Thabuis e Palloix (1999), mas a real fonte da resistência de PIM-025 não é divulgada (NOGUEIRA et al., 2012).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar se a resistência encontrada em PIM-025 (onde a banda de 444 pb do marcador CAPS está ausente) é alélica à encontrada em Myr-29-10 (onde a banda de 444 pb associada ao alelo *Pvr4* está presente).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do pimentão

O pimentão e as pimentas pertencem à família *Solanaceae* e ao gênero *Capsicum*, que é originário das regiões tropicais e subtropicais da América (BENTO et al., 2013; MO et al., 2015). Um estudo recente aponta o México como possível centro de origem da espécie *Capsicum annuum* L. (KRAFT et al., 2014). Após o processo de domesticação, os pimentões e pimentas foram levados para a Europa, e posteriormente difundidos por todo mundo (ARACELI et al., 2009; BENTO et al., 2013).

O gênero *Capsicum* possui cerca de 31 espécies, das quais cinco são mais amplamente cultivadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens* (DI DATO et al., 2015a). Dessas cinco espécies, *Capsicum annuum* L (2n=24) é a mais cultivada do gênero (KRAFT et al., 2014; MO et al., 2015).

Dentre as hortaliças cultivadas no Brasil, o pimentão está entre as principais (GOMIDE; MALUF; GOMES, 2003; RUFINO; PENTEADO, 2006), sendo a terceira solanácea mais cultivada, superada apenas pelo tomate e pela batata.

O Brasil é considerado um dos centros de diversidade do gênero *Capsicum*, especialmente as regiões de Mata Atlântica. Além disso, no Brasil, este gênero possui grande importância econômica e cultural uma vez que os frutos são utilizados no preparo de pratos típicos, compreendendo os pimentões, as pimentas doces para páprica, as pimentas picantes, além de variedades ornamentais (SUDRÉ et al., 2010).

No país, o pimentão é em grande parte consumido verde, imaturo (70%). Em menor escala (30%), é consumido também no estágio de frutos maduros



(SEDIYAMA; VIDIGAL; JACOB, 2014) (vermelhos ou amarelos, dependendo da cultivar). A área cultivada com pimentão anualmente no país é cerca de 13.000 hectares, com produção aproximada de 290 mil toneladas (MAROUELLI; SILVA, 2012). O pimentão é cultivado em todos os estados, concentrando-se nos estados de São Paulo e Minas Gerais (CARVALHO, 2013).

Em 2012, o Estado de São Paulo produziu 65.637,27 toneladas e a área cultivada foi de 2.276,78 hectares, alcançando uma produtividade média de 28,83 toneladas por hectare (CARVALHO, 2013). No ano de 2013, o Estado de São Paulo produziu 52.545 toneladas de pimentão (AGRIANUAL, 2013).

Nos últimos anos, tem sido observado um aumento significativo na produção de pimentão, principalmente após a utilização de cultivares híbridas (CARVALHO, 2013; GOMIDE; MALUF; GOMES, 2008). As principais vantagens de utilizar híbridos F1 são a heterose, que costuma ser pronunciada em pimentão e a maior resistência dos híbridos a doenças em decorrência da natureza dominante dos genes que controlam essas resistências (CARVALHO, 2013).

## **2.2 Melhoramento genético de pimentão**

O pimentão começou a ser cultivado no Brasil em escala comercial provavelmente a partir da década de 20. As primeiras cultivares plantadas tinham frutos de formato cônico e eram supostamente de origem espanhola (CARVALHO, 2013; SILVA, 2002).

Estas cultivares com frutos de formato cônico foram intensamente utilizadas entre os anos de 1920 e 1950, e se espalharam para as regiões de São Paulo e para a Baixada Fluminense. Os produtores provavelmente fizeram seleções nessas populações iniciais, originando cultivares de polinização aberta como Moura, Avelar, Casca Dura, Ikeda, entre outras, que predominaram em

plantios comerciais de pimentão no país (CARVALHO, 2013; ECHER; COSTA, 2002).

O primeiro programa de melhoramento de pimentão foi implantado no início da década de 60, sob coordenação do pesquisador Hiroshi Nagai, no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), visando localizar fontes de resistência ao *Potato virus Y*, o potyvirus causador da principal doença da época (ECHER; COSTA, 2002), bem como combinar essa resistência com características desejáveis de outras cultivares e prevenir a "quebra" da resistência através da caracterização de estirpes do patógeno e de genótipos que conferissem resistência.

Através de cruzamentos seguidos de seleções para resistência a estirpes de PVY, H. Nagai lançou a série Agronômico, da qual a cultivar Agronômico 10G passou a ser, durante muitos anos (até meados da década de 80), a principal cultivar no Sul do país. Nessa mesma década, foram registrados em plantações comerciais nos estados de Minas Gerais e São Paulo, surtos de uma nova estirpe de potyvirus infectando as cultivares de pimentão resistentes ao PVY (ECHER; COSTA, 2002). Essa nova estirpe, capaz de vencer as fontes de resistência até então utilizadas, foi primeiramente denominada de PVY<sup>M</sup> e é hoje considerada como uma nova espécie, conhecida como *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (INOUE-NAGATA et al., 2002). Desde então, o mosaico amarelo do pimentão passou a ser reconhecido como a principal virose nos polos de produção, prejudicando lavouras com cultivares suscetíveis.

Até o fim da década de 80 as cultivares utilizadas pelos produtores, além de serem suscetíveis ao PepYMV (ECHER; COSTA, 2002), foram desenvolvidas em países de clima temperado e eram adaptadas às condições brasileiras apenas para o cultivo protegido, única situação em que estas apresentavam desempenho superior às cultivares de polinização aberta (LORENTZ et al., 2005).

Somente nos anos 1990 é que surgiram os primeiros híbridos comerciais de pimentão, desenvolvidos em condições brasileiras, com a introdução e fixação de novos padrões heteróticos nos programas de melhoramento genético das empresas privadas, e posteriormente também incorporando resistências a doenças, como as viroses causadas por potyvirus (NOGUEIRA, 2010).

Atualmente, em sua maioria, os programas de melhoramento têm-se dedicado à obtenção de híbridos que aliam produtividade à resistência múltipla a doenças (CARVALHO, 2013), visto que estas – em especial as causadas por potyvirus - são o principal entrave para a produtividade de *Capsicum* spp (DI DATO et al., 2015).

### 2.3 Potyviroses

Os potyvirus constituem um dos grupos mais numerosos de fitovírus, atingindo uma ampla gama de hospedeiros com mais de 30% das espécies de vírus descritos (CHUNG et al., 2008). As espécies virais classificadas neste gênero são capazes de infectar mais de 2000 espécies de plantas (FAUQUET et al., 2005), e afetam severamente a produção de culturas economicamente importantes, especialmente aquelas pertencentes à família das *Solanaceae* (KIM et al., 2015).

As potyviroses podem ser transmitidas por uma ou mais espécies de afídeos (modo não persistente), mecanicamente e via enxertia. Alguns vírus também podem ser transmitidos via sementes; no entanto, em espécies do gênero *Capsicum*, este fato não tem sido conclusivamente provado (LOEBENSTEIN; KATIS, 2014).

Há no mínimo 11 espécies diferentes de potyvirus que causam doenças em pimentas e pimentões em diferentes partes do mundo (LOEBENSTEIN; KATIS, 2014).

Todos os potyvirus formam corpos de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas “cata-ventos”, sendo esta uma característica relevante para identificação de espécies pertencentes à família

*Potyviridae*. Estes vírus possuem partículas alongadas, flexuosas e genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, de sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA viral possui uma proteína de origem viral denominada VPg, ligada covalentemente à extremidade 5’ e uma cauda poli-A localizada na extremidade 3’ sendo envolto por aproximadamente 2.200 cópias de uma proteína capsidial (KING et al., 2011).

A proteína capsidial é importante para o desenvolvimento da infecção viral, pois está relacionada aos movimentos célula-a-célula, a longa distância e na replicação viral. Na região N-terminal está localizada uma sequência de aminoácidos altamente conservada entre os potyvirus transmitidos por afídeos. Mutações de aminoácidos nesta sequência ou mudanças em áreas próximas resultam na perda ou na redução da transmissão dos vírus pelos afídeos (KING et al., 2011).

Os sintomas ocasionados por estes vírus variam de acordo com a espécie, com a estirpe, com o genótipo do hospedeiro e com as condições ambientais, variando desde infecção latente seguida ou não por deformação foliar, até necrose pronunciada das folhas e do caule, que pode culminar com a morte da planta (MURPHY, 2002).

#### **2.4 Pepper yellow mosaic virus (PepYMV)**

Na década de 1980, uma nova estirpe de vírus primeiramente denominada PVY<sup>M</sup> (NAGAI, 1983) foi identificada em plantações comerciais de pimentão em São Paulo e Minas Gerais, infectando as cultivares então resistentes: Agrônômico 10G, Magda, Margareth e Ikeda (ECHER; COSTA,

2002). Inoue-Nagata et al. (2002) verificaram que se tratava de uma nova espécie de potyvirus pela clonagem e análise da sequência da capa proteica do vírus que revelou uma proteína de 278 aminoácidos com identidade de 77,4% com a capa proteica do *Pepper severe mosaic virus*, a espécie mais relacionada do gênero. Em função desses resultados, os autores propuseram um novo nome para o vírus - "*Pepper yellow mosaic virus*" (PepYMV).

A espécie PepYMV, causadora da principal doença virótica de pimentão no Brasil (BENTO et al., 2013; ECHER; COSTA, 2002), é de ocorrência natural nas regiões produtoras do país (LOEBENSTEIN; KATIS, 2014), provocando a doença conhecida vulgarmente como mosaico amarelo do pimentão. No Estado do Espírito Santo, essa espécie também foi relatada infectando plantas de tomates em plantios comerciais (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2004).

Os sintomas ocasionados pela infecção pelo PepYMV em pimentão incluem o enrolamento das folhas, desenvolvimento de mosaico verde-amarelado, nanismo das plantas e deformação dos frutos (BENTO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2013).

Atualmente, o genoma do PepYMV já foi completamente sequenciado. Em um estudo realizado por Lucinda et al. (2012), foi constatado que a sequência do vírus possui 9.745 nucleotídeos, desconsiderando a cauda poli-A. Além disso, a espécie PepYMV possui uma similaridade de 63.84% com o *Pepper mottle virus* (PepMoV), seguido pelo *Verbena virus Y* (VVY, 62.11%), *Potato virus Y* (PVY, 62.07%) e *Peru tomato mosaic virus* (PTV, 62.00%).

## **2.5 Melhoramento genético visando resistência ao PepYMV**

Variabilidade genética é o requisito básico para se ter sucesso em qualquer programa de melhoramento genético (HASAN et al., 2015). A existência de variabilidade genética no gênero *Capsicum* tem permitido

controlar com eficiência, via resistência genética, as doenças viróticas causadas pelo complexo potyvirus (NOGUEIRA et al., 2012).

Fontes de resistência têm se mostrado eficientes e duradouras em condições de inoculação artificial e em nível de campo para o controle do PepYMV (CARANTA; THABUIS; PALLOIX, 1999; ECHER; COSTA, 2002).

Em *Capsicum* spp, as primeiras fontes de resistência ao PepYMV foram encontradas em *C. annuum*, “Criollo de Morelos” e *C. chinense* PI 159236. Outras fontes de resistência foram identificadas em *C. chinense* e *C. baccatum* var. *pendulum* (BENTO et al., 2009). Apesar da identificação de resistência em diferentes espécies do gênero *Capsicum*, os mecanismos envolvidos nesta resistência ainda não são bem elucidados (GONÇALVES et al., 2013).

A resistência a potyvirus no pimentão pode ser controlada por pelo menos um dos locos gênicos da série *pvr*, os quais os autores denominaram: *pvr1*; *pvr2*; *pvr3*; *Pvr4*; *pvr5*; *pvr6* e *Pvr7* (CARANTA; THABUIS; PALLOIX, 1999; GRUBE et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2012; PARRELLA et al., 2002).

Em sua maioria, esses genes conferem resistência a duas ou mais espécies de potyvirus. Com exceção do loco *pvr3*, todos os demais da série *pvr* estão associados a um ou mais marcadores moleculares descritos (CARANTA; THABUIS; PALLOIX, 1999).

Em *Capsicum annuum* L. “Serrano Criollo de Morelos-334”, foi identificado mais um gene cuja herança é monogênica e recessiva, o qual foi denominado *pvr8* (ARNEDO-ANDRÉS; LUIS-ARTEAGA; GIL-ORTEGA, 2006), de acordo com a nomenclatura proposta por Kyle e Palloix (1997). O gene *pvr8* confere resistência ao potyvirus *Potato virus Y* (PVY) (ARNEDO-ANDRÉS; LUIS-ARTEAGA; GIL-ORTEGA, 2006).

Em um estudo recente foi identificado mais um gene de resistência ao *Pepper mottle virus* (PepMoV), uma outra espécie de potyvirus, em *Capsicum*

*annuum* cv. Floral Gem (EUA). Este gene, localizado no cromossomo 6, foi denominado *Pvr9* (TRAN et al., 2015).

Os alelos dominantes dos genes *Pvr4* e *Pvr7* conferem resistência a todos os patótipos das espécies conhecidas e testadas (ARNEDO-ANDRÉS et al., 2002; CARANTA; THABUIS; PALLOIX, 1999). Estes dois genes foram mapeados no cromossomo 10 do pimentão a uma distância de 2 cM um do outro (GRUBE et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2012). Entretanto, *Pvr4* é originado de *C. annuum*, acesso CM-334 (Criollo de Morelos-334) e *Pvr7* de *C. chinense*, acesso ‘PI 159236’ (GRUBE et al., 2000).

Genes recessivos fornecem uma resistência passiva. A multiplicação do vírus é comprometida pela incompatibilidade da interação entre o vírus e os fatores do hospedeiro, que na sua maioria são variantes de fatores de iniciação da tradução em eucariotos (eIF4E) (TRAN et al., 2015). Este fator de iniciação da tradução (eIF4E) do hospedeiro é o fator necessário para multiplicação do potyvirus dentro do hospedeiro, e a proteína VPg (*Viral protein genome-linked*) é o fator viral que interage diretamente com a eIF4E, promovendo a multiplicação do potyvirus (DIAZ-PENDON et al., 2004). Em contrapartida, genes dominantes conferem uma resistência ativa através da codificação de proteínas de resistência que reconhecem os efetores do patógeno, ou seja, os fatores de avirulência. Estes genes de resistência codificam proteínas que possuem um sítio de ligação de nucleotídeos (NBS) e uma região repetitiva rica em leucina (LRR). O NBS compreende um “bolso” de ligação de nucleotídeos capaz de ligar e hidrolizar ATP, e é responsável por sinalizar respostas de resistência, e a LRR está envolvida no reconhecimento do fator de avirulência (TRAN et al., 2015).

No Brasil, várias fontes de resistência de amplo espectro à estirpe comum de PVY e a PepYMV têm sido identificadas, entre elas as resistências encontradas no acesso CM-334, e em algumas linhagens e híbridos comerciais, e

nas cultivares de polinização aberta Myr-29 e Myr-10 (ECHER; COSTA, 2002). O genótipo Myr-29-10 é resistente ao PepYMV, e está associado a um marcador tipo CAPS codominante que está a  $2,1 \pm 0,8$  cM do loco *Pvr4* e gera bandas de 458pb nos genótipos suscetíveis (*Pvr4*<sup>+</sup>/*Pvr4*<sup>+</sup>) e 444 pb para os resistentes (*Pvr4*/*Pvr4*) (NOGUEIRA et al., 2012).

O acesso CM-334 cedido pela empresa Sakata Sudamerica, proveniente da Universidade Federal de Viçosa (CM-334-UFV) distingue-se do CM-334 cedido por Carole Caranta proveniente do Institut National de La Recherche Agronomique (CM-334-INRA). Embora ambos os acessos tenham sido resistentes ao PepYMV, apenas em CM-334-INRA a resistência foi associada à banda de 444 pb (*Pvr4*/*Pvr4*) (NOGUEIRA et al., 2012).

A linhagem PIM-025 não apresenta a banda de 444 pb, associada ao alelo *Pvr4*, embora seja resistente ao PepYMV. É possível que esta resistência seja originária do acesso CM-334-UFV, e não do 'CM-334' de Caranta, Thabuis e Palloix (1999) (NOGUEIRA et al., 2012), mas a real fonte de resistência de PIM-025 não é divulgada.

É possível que a resistência de PIM-025 seja conferida pelo próprio *Pvr4*, obtido a partir de uma introdução onde a banda CAPS de 444 pb não esteja a ele associada, como (possivelmente) em CM-334-UFV. Por outro lado, é também possível que ela seja conferida por outro alelo de resistência com ação gênica dominante (dada a reação de resistência do F<sub>1</sub>, segundo Nogueira et al. (2012), seja ele *Pvr7*, *Pvr9*, ou outro ainda não relatado na literatura.



### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A cultura do pimentão possui grande importância econômica, sendo a terceira solanácea mais consumida no Brasil. Avanços na melhoria dos sistemas produtivos da cultura assim como a utilização de cultivares híbridas têm contribuído para o aumento na produção nacional. No entanto, problemas fitossanitários têm sido o principal entrave a um aumento expressivo da produtividade. Dentre os problemas fitossanitários os vírus pertencentes ao gênero potyvirus ocupam lugar de destaque. O mosaico amarelo do pimentão causado pelo PepYMV pode ser transmitido por afídeos, mecanicamente e via enxertia. A forma de controle mais eficiente consiste na utilização de genótipos resistentes.

A presença de variabilidade genética no gênero *Capsicum* tem permitido encontrar e introduzir resistência a esse patógeno em cultivares e isto tem sido feito em programas de melhoramento de pimentão. Apesar de haver vários genes que conferem resistência ao PepYMV descritos na literatura, apenas dois da série *pvr* - *Pvr4* e *Pvr7* - têm herança monogênica dominante. Ambos os genes foram mapeados no cromossomo 10 do pimentão e estão localizados a uma distância de 2 cm um do outro. O gene *Pvr4* está associado a um marcador tipo CAPS codominante ( $2,1 \pm 0,8$  cM).

Através do cruzamento entre dois genótipos resistentes ao PepYMV 'Myr-29-10' (onde a banda de 444 pb associada ao alelo *Pvr4* está presente), e 'PIM-025' (onde a banda de 444 pb do marcador CAPS está ausente), buscou-se identificar se a resistência encontrada em PIM-025 é alélica à encontrada em Myr-29-10.

## REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2013. 480 p.
- ARACELI, A. M. et al. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum Annuum*; Solanaceae) from Mexico. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 96, n. 6, p. 1190-1202, 2009.
- ARNEDO-ANDRÉS, M. S. et al. Development of RAPD and SCAR markers linked to the Pvr4 locos for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 6/7, p. 1067-1074, 2002.
- ARNEDO-ANDRÉS, M. S.; LUIS-ARTEAGA, M.; GIL-ORTEGA, R. New inheritance studies related to Potato Virus Y (PVY) resistance in *Capsicum annuum* L. "Serrano Criollo de Morelos-334". **Euphytica**, Wageningen, v. 151, n. 1, p. 95-101, 2006.
- BENTO, C. D. S. et al. Sources of resistance against the Pepper yellow mosaic virus in chili pepper. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 196-201, 2009.
- BENTO, C. S. et al. Inheritance of resistance to Pepper yellow mosaic virus in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 1074-1082, 2013.
- CARANTA, C.; THABUIS, A.; PALLOIX, A. Development of a CAPS marker for the Pvr4 locos: a tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 6, p. 1111-1116, 1999.
- CARVALHO, R. de C. **Obtenção de híbridos de pimentão com resistência a múltiplos patógenos**. 2013. 59 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- CHUNG, B. Y. W. et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, 2008.
- DI DATO, F. et al. Genetic diversity and assessment of markers linked to resistance and pungency genes in *Capsicum* germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 204, n. 1, p. 103-119, 2015.

DIAZ-PENDON, J. A. et al. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 3, p. 223-333, 2004.

ECHER, M. D. M.; COSTA, C. P. da. Reaction of sweet pepper to the potato virus y (PVY<sup>m</sup>) 1. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 2, p. 309-314, 2002.

FAUQUET, C. et al. **Virus taxonomy**. 9<sup>th</sup> ed. San Diego: Elsevier Academic, 2005. 1327 p.

GOMIDE, M. L.; MALUF, W. R.; GOMES, L. A. A. Capacidade de combinação de linhagens elite de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 740-748, maio/jun. 2008.

GOMIDE, M. L.; MALUF, W. R.; GOMES, L. A. A. Heterose e capacidade combinatória de linhagens de pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1007-1015, set./out. 2003.

GONÇALVES, L. S. A. et al. Peroxidase is involved in pepper yellow mosaic virus resistance in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 1411-1420, 2013.

GRUBE, R. C. et al. Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus resistance gene cluster in *Capsicum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 5/6, p. 852-859, 2000.

GRUBE, R. C.; RADWANSKI, E. R.; JAHN, M. Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae. **Genetics**, Austin, v. 155, n. 2, p. 873-887, 2000.

HASAN, R. et al. Assessment of genetic divergence in Chilli (*Capsicum annuum* L.) genotypes. **Plant Gene and Trait**, Richmond, v. 6, n. 3, p. 1-5, 2015.

INOUE-NAGATA, A. K. et al. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 4, p. 849-855, 2002.

KIM, S. B. et al. RNA-Dependent RNA Polymerase (N1b) of the Potyviruses is an avirulence factor for the broad-spectrum resistance gene Pvr4 in *Capsicum annuum* cv. CM334. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 3, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119639>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

- KING, A. et al. **Virus taxonomy**. 5<sup>th</sup> ed. Surrey: Elsevier, 2011. 1272 p.
- KRAFT, K. H. et al. Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, n. 17, p. 1-6, 2014.
- KYLE, M. M.; PALLOIX, A. Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. **Euphytica**, Wageningen, v. 97, n. 2, p. 183-188, 1997.
- LOEBENSTEIN, G.; KATIS, N. **Control of plant virus diseases: seed-propagated crops: advances in virus research**. 90<sup>th</sup> ed. Oxford: Academic, 2014. 530 p.
- LORENTZ, L. H. et al. Variabilidade da produção de frutos de pimentão em estufa plástica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 316-323, 2005.
- LUCINDA, N. et al. Complete genome sequence of pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 157, n. 7, p. 1397-1401, 2012.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E. et al. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 2002-2004, 2004.
- MAROUELLI, W. A.; SILVA, W. L. C. I. **Irrigação na cultura do pimentão**. Brasília: EMBRAPA, 2012. 20 p.
- MO, H. et al. Horticultural and chemical quality characterization of accessions selected from four species of *Capsicum*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 1, p. 54-66, 2015.
- MURPHY, J. F. The relationship between Pepper mottle virus source leaf and spread of infection through the stem of *Capsicum* sp. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 9, p. 1789-1797, 2002.
- NAGAI, H. Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência ao vírus Y. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 3-9, nov. 1983.

NOGUEIRA, D. W. **Seleção assistida por marcadores moleculares e capacidade combinatória de linhagens de pimentão com resistência múltipla a doenças**. 2010. 83 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

NOGUEIRA, D. W. et al. Seleção assistida com uso de marcador molecular para resistência a potyvírus em pimentão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 7, p. 955-963, jul. 2012.

PARRELLA, G. et al. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 6/7, p. 855-861, 2002.

REVERS, F.; NICAISE, V. Plant resistance to infection by viruses. In: \_\_\_\_\_. **Encyclopedia of life sciences, virology**. Chichester: J. Wiley, 2014. v. 1, p. 1-10.

RUFINO, J. L.; PENTEADO, D. C. S. **Importância econômica, perspectivas e potencialidades de mercado para a pimenta**. Belo Horizonte: EMBRAPA, 2006. 8 p.

SEDIYAMA, M. A. N.; VIDIGAL, S. M.; JACOB, L. L. Nutrição e produtividade de plantas de pimentão colorido, adubadas com biofertilizante de suíno. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p. 588-594, 2014.

SILVA, L. L. **Cruzamentos dialélicos parciais de pimentão**. 2002. 100 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

SUDRÉ, C. P. et al. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 283-294, 2010.

TRAN, P. T. et al. Molecular characterization of Pvr9 that confers a hypersensitive response to Pepper mottle virus (a potyvirus) in *Nicotiana benthamiana*. **Virology**, London, v. 481, p. 113-123, Mar. 2015.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**ARTIGO 1 Resistência genética de genótipos de pimentão ao PEPYMV**  
*(Pepper Yellow Mosaic Virus)*

**Artigo redigido nas normas da revista “Euphytica”**

## RESISTÊNCIA GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE PIMENTÃO AO

### PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*)

Jéssica Figueiredo Rezende<sup>1</sup>, Wilson Roberto Maluf<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras / UFLA, Departamento de Biologia, Caixa Postal 3037, CEP 37.200-000. Lavras, MG.  
e-mail: jessica.rfigueiredo@gmail.com

<sup>2</sup>UFLA, Departamento de Agricultura.  
e-mail: wrmaluf@dag.ufla.br

**RESUMO** - A existência de variabilidade genética no gênero *Capsicum* tem permitido controlar com eficiência as doenças viróticas causadas pelo complexo potyvirus, que podem ser controladas por pelo menos um dos locos gênicos da série *pvr* descritos na literatura. Desses, apenas *Pvr4* e *Pvr7* têm herança monogênica dominante, sendo ambos localizados no cromossomo 10 do pimentão a 2 cM de distância um do outro. O gene *Pvr4* está associado a um marcador tipo CAPS codominante ( $2,1 \pm 0,8$  cM). O objetivo deste trabalho foi determinar se a resistência ao potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), encontrada no genótipo de pimentão PIM-025, sem o marcador *Pvr4* é alélica ao mesmo, ou trata-se da existência de outro gene de resistência. Através da segregação na geração F<sub>2</sub>, foi possível inferir que a resistência do genótipo PIM-025 o qual apresenta padrão de banda 458 pb ( $Pvr4^+/Pvr4^+$ ) é devida a um gene diferente daqueles descritos na literatura até o presente momento.

**Palavras-chave:** *Capsicum annuum* L., PepYMV, genes, resistência.

**ABSTRACT-** Genetic variability in *Capsicum* had been allowing to control potyviruses effectively. Potyvirus resistance can be promoted by one of the *pvr* genes already known. Between these genes, only *Pvr4* and *Pvr7* have

dominant monogenic inheritance, and are located in chromosome 10 (2 cM distance) in pepper genome. The *Pvr4* gene is linked to a codominant marker ( $2,1 \pm 0,8$  cM). The objective of this research was to determine if the resistance present in PIM- 025 genotype, which is not associated to the CAPS marker *Pvr4*, is allelic to this gene, or if is another *pvr* series gene, indicating the existence of a new gene not described before. Through the  $F_2$  segregation, our results indicated that the genotype resistance is not associated with *Pvr4* marker, and feature susceptible band pattern ( $Pvr4^+/Pvr4^+$ ), is due a different gene from those described in the literature so far.

**Key words:** *Capsicum annuum* L., PepYMV, genes, resistance.

## 1 Introdução

Os pimentões e pimentas do gênero *Capsicum* estão entre as espécies olerícolas mais importantes no mundo e pertencem à família das Solanaceae (Devran et al. 2015). O gênero *Capsicum* possui cerca de 31 espécies, das quais apenas cinco são amplamente cultivadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens* (Di Dato et al. 2015). Dessas cinco espécies, o pimentão, *Capsicum annuum* L. ( $2n=24$ ) é a mais cultivada (Kraft et al., 2014; Mo et al., 2015).

Assim como as demais culturas, o pimentão está sujeito ao ataque de muitos patógenos que ocasionam uma grande perda de produtividade e oneram os custos de produção. Dentre as doenças viróticas, o potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) tem se destacado por causar grande prejuízo nas lavouras do centro-sul do Brasil (Moulin



et al., 2014). Hoje, a principal doença virótica na cultura do pimentão no Brasil é o mosaico amarelo do pimentão, causada por este vírus (Lucinda et al., 2012). Os primeiros relatos da ocorrência desse patógeno no Brasil ocorreram em 1980 em plantios comerciais de pimentão nos estados de São Paulo e Minas Gerais, sendo a estirpe a princípio classificada como PVY<sup>M</sup> por Nagai (1983). No entanto, em 2001, concluiu-se que se tratava de uma nova espécie de potyvirus, denominada PepYMV (Inoue- Nagata et al. 2002).

Fontes de resistência a este vírus têm sido encontradas em genótipos de pimentão. Atualmente há uma ampla diversidade de híbridos resistentes ao PepYMV disponíveis no mercado, no entanto, não se tem conhecimento do controle da resistência em todos estes híbridos. Apesar dessa grande disponibilidade de híbridos resistentes, recentemente tem havido relatos de quebra de resistência por novas estirpes do PepYMV (Lucinda et al. 2012).

Os sintomas ocasionados pelo PepYMV em pimentão incluem o enrolamento da folhas, desenvolvimento de mosaico verde-amarelado, nanismo das plantas e deformação dos frutos (Bento et al., 2013; Gonçalves et al., 2013).

A principal forma de controle do PepYMV é a resistência genética (Bento et al. 2013), a qual apresenta vantagens econômicas e ecológicas (Gonçalves et al., 2013; Revers and Nicaise, 2014). Variabilidade genética disponível na espécie ou no “gene pool” da espécie a ser melhorada é o requisito básico para se ter sucesso em qualquer programa de melhoramento genético (Hasan et al. 2015). A existência de

variabilidade genética no gênero *Capsicum* tem permitido controlar com eficiência, via resistência genética, as doenças viróticas causadas pelo complexo potyvirus (Nogueira et al. 2012). A resistência a potyvirus no pimentão pode ser controlada por pelo menos um dos locos gênicos da série *pvr*, os quais os autores denominaram: *pvr1*; *pvr2*; *pvr3*; *Pvr4*; *pvr5*; *pvr6* e *Pvr7* (Caranta et al., 1999; Grube et al., 2000a; Parrella et al., 2002). Em sua maioria, esses alelos são resistentes a duas ou mais espécies de potyvirus (Nogueira et al. 2012).

Em *Capsicum annuum* L. “Serrano Criollo de Morelos-334”, foi identificado mais um gene de resistência a potyvirus cuja herança é monogênica e recessiva, o qual foi denominado *pvr8* (Arnedo-Andrés et al. 2006), de acordo com a nomenclatura proposta por Kyle e Palloix (1997). O gene *pvr8* confere resistência ao potyvirus *Potato virus Y* (PVY) (Arnedo-Andrés et al. 2006). No entanto, não se sabe se o gene *pvr8* também confere resistência ao PepYMV.

Recentemente foi descrito um novo gene de resistência ao potyvirus *Pepper mottle virus* (PepMoV), denominado *Pvr9*, encontrado em *C. annuum* cv. Floral Gem e localizado no cromossomo 6 (Tran et al. 2015). No entanto, este gene de resistência ainda não foi testado para o PepYMV, visto que até então esta espécie só foi relatada no Brasil (King et al. 2011).

Da série *pvr* descrita por Grube et al. (2000a), apenas *Pvr4* e *Pvr7* possuem herança monogênica dominante. Estes dois locos estão localizados no cromossomo 10 de *Capsicum*

*annuum*, a aproximadamente 2 cM de distância um do outro.

Com exceção do *pvr3*, todos os demais alelos da série *pvr* estão associados a um ou mais marcadores moleculares, seja do tipo RFLP, ou obtidos a partir de cDNA. O alelo *Pvr4*, para cuja identificação se utilizavam, inicialmente, marcadores do tipo AFLP (Caranta et al. 1999; Arnedo-Andrés et al., 2002), foi convertido em marcador PCR com iniciadores específicos (Parrella et al. 2002). Desenvolvido por Caranta, Thabuis e Palloix (1999), o marcador PCR com iniciadores específicos é do tipo CAPS, codominante, e este marcador está a  $2,1 \pm 0,8$  cM do alelo *Pvr4* e gera bandas de 458 pb nos genótipos suscetíveis e 444 pb nos resistentes, o que constitui uma importante ferramenta para identificação e seleção em diferentes genótipos. O genótipo resistente CM-334 utilizado nesta identificação foi o existente no INRA (CM-334-INRA) (Nogueira et al. 2012).

O acesso CM-334-UFV ('Criollo de Morelos-334', proveniente da Universidade Federal de Viçosa) distingue-se do CM-334-INRA ('Criollo de Morelos-334', proveniente do Institut National de La Recherche Agronomique); embora ambos os acessos sejam resistentes ao PepYMV, apenas em CM-334-INRA a resistência foi associada à banda de 444 pb (*Pvr4/Pvr4*) (Nogueira et al. 2012).

O marcador revela a presença de uma banda de 444 pb, que caracteriza os genótipos homozigotos resistentes (*Pvr4/Pvr4*), nas plantas da cultivar Myr-29 e no acesso CM-334-INRA. Genótipos suscetíveis como a cultivar comercial Ikeda apresentam uma banda de 458 pb, característica dos

genótipos homozigotos suscetíveis ( $Pvr4^+/Pvr4^+$ ). O híbrido Konan-R apresenta duas bandas, uma de 444 pb e outra de 458 pb, que caracteriza o genótipo resistente heterozigoto ( $Pvr4^+/Pvr4$ ) (Nogueira et al. 2012).

Alguns genótipos resistentes ao PepYMV não estão associados à banda de 444 pb ( $Pvr4/Pvr4$ ), como é o exemplo do acesso CM-334-UFV e da linhagem PIM-025, obtida a partir do híbrido comercial Magali-R (Nogueira et al. 2012). Através do estudo da segregação da geração  $F_2$ , oriunda do cruzamento entre uma linhagem resistente homozigota  $Pvr4/Pvr4$  (uma banda de 444 pb) e uma linhagem resistente homozigota  $Pvr4^+/Pvr4^+$  (uma banda de 458 pb), é possível considerar pelo menos três hipóteses: (a) ambos os genótipos resistentes seriam portadores do alelo  $Pvr4$ , no entanto, este alelo em PIM-025 não estaria associado ao marcador CAPS de 444 pb, devido a prévia ocorrência de recombinação; neste caso na geração  $F_2$  100% das plantas seriam resistentes, não ocorrendo segregação para reação de resistência ao PepYMV, (b) o gene que controla a resistência ao PepYMV em PIM-025 pode ser alélico ao  $Pvr7$ , e neste caso a geração  $F_2$  apresentaria plantas suscetíveis numa frequência muito baixa, equivalente à esperada para uma distância de 1.2-1.6 cM (distância entre  $Pvr4$  e  $Pvr7$ ) (c) o gene não é alélico ao  $Pvr4$  ou  $Pvr7$ , e a menos que estivesse no entorno destes, a população  $F_2$  apresentaria uma porcentagem de plantas suscetíveis equivalentes a uma distância maior que 1.2-1.6 cM (que é a distância entre  $Pvr4$  e  $Pvr7$ ). Caso as resistências ao

PepYMV nos diferentes genótipos fossem monogênicas e a segregação independente, a porcentagem de plantas suscetíveis ao PepYMV em F<sub>2</sub> seria 25%, e as hipóteses (a) e (b) teriam de ser rejeitadas.

Este trabalho teve por objetivo estudar o controle genético da resistência ao PepYMV presente na linhagem PIM-025, e testar a hipótese de alelismo em *Pvr4*.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Local

As avaliações da resistência dos genótipos ao PepYMV foram realizadas em casa de vegetação na área experimental da empresa HortiAgro Sementes SA, situada no município de Ijaci – MG. Sua altitude é de 842 m, está situado a 21° 09' 50" de latitude Sul e a 44° 55' 00" de longitude oeste. Os trabalhos de laboratório foram realizados no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

### 2.2 Genótipos utilizados para o teste de alelismo e estudo de herança

Ambos os genótipos utilizados para estudo de herança e teste de alelismo apresentam resistência ao PepYMV, sendo diferentes quanto a associação ao marcador *Pvr4*. Os genitores utilizados foram: 'Myr-29-10' (P<sub>1</sub>), cultivar de polinização aberta com marca para *Pvr4* (*Pvr4/Pvr4*); e a linhagem, 'PIM-025' (P<sub>2</sub>), obtida a partir do híbrido Magali-R, resistente ao PepYMV e sem marca para o *Pvr4* (*Pvr4<sup>+</sup>/Pvr4<sup>+</sup>*) (Nogueira et al. 2012).

As populações experimentais obtidas e testadas foram:  $F_1(P_1 \times P_2)$ ,  $F_2(P_1 \times P_2)$ ,  $RC_1(P_1) = \{[F_1(P_1 \times P_2)] \times P_1\}$  e  $RC_1(P_2) = \{[F_1(P_1 \times P_2)] \times P_2\}$ .

### 2.3 Genótipos utilizados como testemunhas

Foram avaliados os seguintes genótipos de pimentão, incluindo cultivares comerciais resistentes a PepYMV: 'Magali-R', híbrido da Sakata Sudamerica, com procedência da resistência ao PepYMV não revelada; 'Konan-R', cultivar híbrida da HortiAgro/Agristar do Brasil, oriunda do cruzamento entre 'Myr-29' e uma linhagem suscetível a PepYMV; 'Mallorca', cultivar híbrida com padrão de banda não previamente determinado; acessos resistentes a PepYMV, Criollo de Morelos 'CM-334-UFV', proveniente da Universidade Federal de Viçosa, cedido pela empresa Sakata Sudamerica, e Criollo de Morelos 'CM-334-INRA', proveniente do Institut National de La Recherche Agronomique, cedido por Carole Caranta; 'PIM-HE-133', híbrido experimental resistente a PepYMV, oriundo do cruzamento entre Myr-29-10-08 e a linhagem PIM-013; cultivar comercial de polinização aberta 'Ikeda', suscetível ao PepYMV; e 'PIM-013', linhagem suscetível ao PepYMV (Quadro 1).

### 2.4 Condução do experimento

Os genótipos testados foram semeados em bandejas de isopor de 128 células, com substrato comercial Topstrato®, em delineamento inteiramente casualizado e com número variável de parcelas (cada parcela foi constituída de

oito plantas). Foram utilizadas 48 plantas para cada um dos tratamentos Myr-29- 10 ( $P_1$ ), PIM-025 ( $P_2$ ),  $F_1$  ( $P_1 \times P_2$ ), PIM-013, Ikeda, PIM-HE-133, Konan-R, Magali-R e Mallorca; 640 plantas para  $F_2$  ( $P_1 \times P_2$ ); 320 plantas para cada retrocruzamento e 168 plantas para CM-334-UFV e CM-334-INRA, com um total de 2048 plantas no experimento (Quadro 1). Foram semeadas em cada célula três sementes e após a germinação e emergência, procedeu-se o desbaste deixando apenas uma plântula por célula.

Quadro 1 Número de parcelas e total de plantas de cada tratamento utilizado no experimento em questão.

<b>Tratamento</b>	<b>Nº Parcelas<sup>A</sup></b>	<b>Nº Plantas</b>	<b>Padrão de banda esperado segundo Nogueira et al. (2012)</b>
Myr-29-10 ( $P_1$ )	6	48	444 pb
PIM-025 ( $P_2$ )	6	48	458 pb
$F_1(P_1 \times P_2)$	6	48	444/458 pb
$F_2(P_1 \times P_2)$	80	640	(c)
$F_1 \times P_1$	40	320	(c)
$F_1 \times P_2$	40	320	(c)
Ikeda	6	48	458 pb
PIM-013	6	48	(b)
CM-334-INRA	21	168	444 pb
CM-334-UFV	21	168	458 pb
PIM-HE-133	6	48	(b)
Konan-R	6	48	444/458 pb
Magali-R	6	48	458 pb
Mallorca	6	48	(b)
<b>Total</b>	<b>256</b>	<b>2048</b>	-

A Cada parcela foi constituída de 8 plantas. (b) Não determinado por Nogueira (2012). (c) População segregante para o padrão de bandas.

As inoculações do isolado de PepYMV e as avaliações de sintomas foram feitas em plantas mantidas nas bandejas. Para isso, foi utilizado um isolado cedido pela Sakata Seed Sudamerica, Bragança Paulista - SP, coletado no Município de Lins - SP, proveniente de plantas de pimentão naturalmente infectadas com sintoma sistêmico e caracterizado sorologicamente.

### 2.5 Manutenção do isolado

Para a manutenção do isolado em condições de armazenamento, plantas de *Nicotiana tabacum* “TNN” e de pimentão da cultivar Ikeda previamente infectadas com PepYMV, foram mantidas em dessecadores com sílica-gel e também em nitrogênio líquido, à temperatura de – 80°C (ultra-freezer). A produção de inoculo para posterior teste dos genótipos de pimentão foi realizada a partir de plantas indicadoras de *N. tabacum* “TNN” mantidas em estufas com telas; as plantas foram substituídas a cada dois meses (Nogueira et al. 2012).

### 2.6 Método de inoculação

Para inoculação, folhas de *N. tabacum* “TNN” infectadas experimentalmente com isolado de PepYMV foram maceradas em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0. Em seguida, as plantas dos genótipos de pimentão a serem avaliadas foram polvilhadas com abrasivo carborundum (400 mesh) e posteriormente, a solução de extrato vegetal foi aplicada por fricção do polegar sobre as folhas. Após a inoculação do vírus, as plantas foram lavadas com água e



mantidas em estufas providas de cobertura de plástico e laterais teladas.

Foram realizadas duas inoculações, para evitar possíveis escapes. A primeira foi realizada quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento, com a primeira folha definitiva plenamente expandida (64 dias após sementeira), e a segunda inoculação foi feita sete dias após a primeira.

### 2.7 Avaliações dos genótipos

As avaliações foram realizadas aos 48, 62, 76, 96 e 133 dias após a segunda inoculação, totalizando cinco avaliações. Considerou-se como o resultado final a avaliação realizada aos 133 dias após a segunda inoculação.

Para cada planta avaliada, foram atribuídas notas que variaram de 1 a 5 (Quadro 2). As plantas foram classificadas como resistentes (notas de 1 a 2), e suscetíveis (notas de 3 a 5).

Quadro 2 Escala descritiva de notas para avaliação da severidade do PepYMV em plantas de pimentão.

<b>Nota</b>	<b>Descrição</b>	<b>Classificação</b>
1	Sem sintomas	Resistente
2	Clareamento internerval	Resistente
3	Mosaico leve	Suscetível
4	Mosaico bem desenvolvido, sem deformação	Suscetível
5	Mosaico amarelo, bolhoso, com deformação	Suscetível

Além da fenotipagem com relação ao sintomas de PepYMV, foi feita a genotipagem dos tratamentos, utilizando o marcador tipo CAPS codominante para o loco *Pvr4*. Para

as extrações de DNA foi coletada aleatoriamente uma planta de por parcela de cada tratamento, num total de 256 amostras. Foram amostradas seis plantas de cada um dos seguintes tratamentos – Myr-29-10 (P<sub>1</sub>), PIM-025 (P<sub>2</sub>), F<sub>1</sub> (P<sub>1</sub> x P<sub>2</sub>), PIM-013, Ikeda, PIM-HE-133, Konan-R, Magali-R e Mallorca; 80 plantas da geração F<sub>2</sub> (P<sub>1</sub> x P<sub>2</sub>); 40 plantas de cada um dos retrocruzamentos; 21 plantas para CM-334-UFV e CM-334-INRA (Quadro 1). Estas amostras foram armazenadas em embalagens plásticas devidamente identificadas e acondicionados em caixa de isopor contendo gelo (procedimento utilizado para minimizar a ocorrência de oxidação). A extração de DNA foi feita em microtubos de 1,5 ml a partir 120 mg de tecido foliar, conforme sugerido por Ferreira e Grattapaglia (1998).

O marcador utilizado foi o marcador do tipo CAPS (codominante), desenvolvido por Caranta et al. (1999). As sequências dos primers foram CSO-F (5'-CGAAGAGAGAAGGTC-3') e CSO-R (5'-TCAGGGTAGGTTATT-3').

As reações de PCR para clivagem dos fragmentos amplificados e eletroforese foram feitas conforme sugerido por Caranta et al. (1999). Plantas com padrão de banda única de 458 pb correspondem, nos casos em que há ligação entre o marcador e o alelo *Pvr4*, aos genótipos suscetíveis homocigóticos (*Pvr4*<sup>+</sup>/*Pvr4*<sup>+</sup>); plantas com padrão de banda única de 444 pb correspondem a genótipos homocigotos resistentes (*Pvr4*/*Pvr4*), enquanto plantas contendo ambas as bandas correspondem aos genótipos resistentes heterocigotos

(*Pvr4<sup>+</sup>/Pvr4*) (Caranta et al. 1999).

### 2.8 Análises

A partir das frequências observadas de indivíduos para as classes fenotípicas, foi testada a hipótese de não alelismo entre o gene de resistência presente em PIM-025 e o alelo *Pvr4*. A hipótese foi testada pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), utilizando um nível nominal de significância de 5%, aplicado às gerações segregantes com relação à resistência ao PepYMV.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Reação de genótipos de pimentão ao PepYMV

Nas parcelas que continham as testemunhas resistentes CM-334-INRA, CM-334-UFV, PIM-HE-133, Konan-R, Mallorca e Magali-R não foram observadas plantas com sintomas do vírus, indicando 100% de resistência (notas 1 e 2). As testemunhas CM-334-INRA, CM-334-UFV, Konan-R e Magali-R apresentaram resultado conforme previamente relatado (Nogueira et al. 2012). No caso das duas testemunhas suscetíveis utilizadas neste experimento, Ikeda e PIM-013, ambas apresentaram sintomas com notas 3 a 5 em 100% das plantas, conforme descrito na literatura (Carvalho, 2013) (Tabela 1).

A reação dos genótipos após inoculação do vírus, confirmam a resistência das linhagens PIM-025 ( $P_2$ ) e Myr-29-10 ( $P_1$ ) ao PepYMV (Tabela 1), pois não foi observada nenhuma planta com sintomas, fato previamente relatado por Nogueira et al. (2012). Em virtude da conhecida constituição

genotípica *Pvr4/Pvr4* de Myr-29-10 ( $P_1$ ) (Figura 1), em  $F_1$  é esperado 100% de plantas resistentes com genótipo heterozigoto *Pvr4<sup>+</sup>/Pvr4* (duas bandas, sendo uma com 458 pb e outra com 444 pb), independentemente de qual seja o loco de resistência presente em PIM-025 - fato que foi observado no experimento.

Assim como em Myr-29-10 ( $P_1$ ), PIM-025 ( $P_2$ ) e  $F_1$  ( $P_1 \times P_2$ ), em  $F_1 \times P_1$  e  $F_1 \times P_2$  também foram observadas 100% de plantas resistentes ao PepYMV. Isto indica que o(s) alelo(s) de resistência em  $P_2$  é (ou são) dominante(s). Entretanto, estes resultados não fornecem evidência de alélismo entre os locos de resistência em Myr-29-10 ( $P_1$ ) e PIM-025 ( $P_2$ ) (Tabela 1).

Já na fenotipagem realizada através da avaliação da severidade do PepYMV em plantas da geração  $F_2$  (Myr-29-10, *Pvr4/Pvr4*  $\times$  PIM-025, *Pvr4<sup>+</sup>/Pvr4<sup>+</sup>*), foi encontrada uma segregação que se ajustou à proporção de 15R:1S ( $P > 0.05$ ). Esta segregação exclui a possibilidade de que o loco que confere resistência ao PepYMV na linhagem PIM-025 seja o *Pvr4*, ou mesmo o loco *Pvr7*, que está ligado ao *Pvr4* por uma distância de 1.2-1.6 cM apenas. Portanto, a hipótese mais provável de estar correta é a hipótese de que o loco não é alélico ao *Pvr4* e nem ao *Pvr7* (Tabela 1). Portanto, possivelmente se trata de um loco distinto, o qual segrega independentemente do *Pvr4* (associado à banda de 444 pb). Este fato pode ser confirmado pelo uso do marcador associado ao loco *Pvr4*.

Tabela 1 - Análise da segregação da resistência ao PepYMV obtidas através da avaliação das populações experimentais P<sub>1</sub> (Myr-29-10), P<sub>2</sub> (PIM-025), F<sub>1</sub> (P<sub>1</sub> X P<sub>2</sub>), F<sub>2</sub> (P<sub>1</sub> X P<sub>2</sub>), F<sub>1</sub> x P<sub>1</sub> e F<sub>1</sub> x P<sub>2</sub>; e das testemunhas Ikeda, PIM-013, CM-334- INRA, CM-334-UFV, PIM-HE-133, Konan-R, Magali-R e Mallorca.

Tratamento	H0	Freq. Obs <sup>1</sup>		$\chi^2$	
		R	S	Calc	Tab
Myr-29-10 (P <sub>1</sub> )	1R:0S	44	0	-	-
PIM-025 (P <sub>2</sub> )	1R:0S	37	0	-	-
F <sub>1</sub> (P <sub>1</sub> x P <sub>2</sub> )	1R:0S	48	0	-	-
F <sub>2</sub> (P <sub>1</sub> x P <sub>2</sub> )	15R:1S	551	40	0,2708 <sup>ns2</sup>	3,84
F <sub>1</sub> x P <sub>1</sub>	1R:0S	310	0	-	-
F <sub>1</sub> x P <sub>2</sub>	1R:0S	299	0	-	-
Ikeda	0R:1S	0	48	-	-
PIM-013	0R:1S	0	42	-	-
CM-334-INRA	1R:0S	126	0	-	-
CM-334-UFV	1R:0S	40	0	-	-
PIM-HE-133	1R:0S	45	0	-	-
Konan-R	1R:0S	47	0	-	-
Magali-R	1R:0S	37	0	-	-
Mallorca	1R:0S	45	0	-	-

<sup>ns</sup>: não significativo ao nível de 5% de significância; H0: hipótese nula; R: resistente; S: suscetível. <sup>1</sup> Com base no número total de plantas em cada geração; <sup>2</sup> Hipótese de não alelismo entre os genes de resistência de P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub> com genes de segregação independente.

Para a confirmação dos resultados foi feita a genotipagem das gerações testadas, através da utilização deste marcador. Genótipos conhecidamente resistentes ao PepYMV e não associados ao marcador codominante do tipo CAPS descrito por Caranta et al. (1999), como é caso da linhagem PIM-025, CM-334-UFV e Magali-R (Nogueira et al. 2012) - apresentaram uma banda de 458 pb

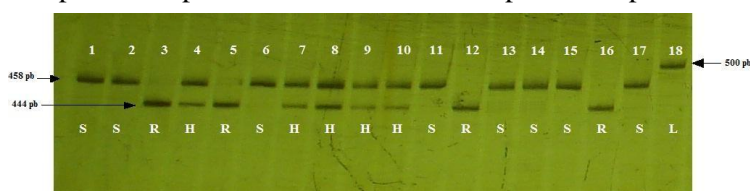
( $Pvr4^+/Pvr4^+$ )(Tabela 2) no gel de poliacrilamida (Figura 1).

Tabela 2 - Caracterização dos genótipos utilizados no experimento quanto à reação ao PepYMV e ao padrão de banda apresentado para o marcador Pvr4.

Genótipos	Reação	Fenótipo no gel de poliacrilamida
Myr-29-10	R	$Pvr4/Pvr4$
PIM-025	R	$Pvr4^+/Pvr4^+$
Ikeda	S	$Pvr4^+/Pvr4^+$
PIM-013	S	$Pvr4^+/Pvr4^+$
CM-334-INRA	R	$Pvr4/Pvr4$
CM-334-UFV	R	$Pvr4^+/Pvr4^+$
PIM-HE-133	R	$Pvr4^+/Pvr4$
Konan-R	R	$Pvr4^+/Pvr4$
Magali-R	R	$Pvr4^+/Pvr4^+$
Mallorca	R	$Pvr4^+/Pvr4^+$

Reação ao PepYMV: R- resistente; S- suscetível. Padrão de banda:  $Pvr4/Pvr4$  - 444 pb;  $Pvr4^+/Pvr4$  - uma banda com 444 pb e outra banda com 458 pb;  $Pvr4^+/Pvr4^+$  - 458 pb.

Figura 1 - Padrão eletroforético de fragmentos de DNA amplificados para o marcador CAPS em plantas de pimentão.



1-PIM-025 (P2); 2- F2 (P1 x P2); 3- F1 x P1; 4- F1 x P2; 5- F2 (P1 x P2); 6- F1 x P2; 7- PIM- HE-133; 8- F2 (P1 x P2); 9- Konan-R; 10- F1 (P1 x P2); 11- PIM-013; 12- CM-334-INRA; 13- Mallorca; 14- CM-334-UFV; 15- Magali-R; 16- Myr-29-10 (P1); 17- Ikeda; 18 - Ladder (500pb). S- apresenta uma banda com 458 pb ( $Pvr4^+/Pvr4^+$ ); R- resistente homocigoto dominante, apresenta uma banda com 444 pb ( $Pvr4/Pvr4$ ); H- resistente heterocigoto, apresenta duas bandas, uma com 458 pb e outra com 444 pb ( $Pvr4^+/Pvr4$ ).

Genótipos resistentes como PIM-025, apresentaram uma banda de 458 pb, característica do genótipo  $Pvr4^+/Pvr4^+$ , conforme relatado por Nogueira et al. (2012). Estes resultados confirmam que o loco que confere resistência ao PepYMV na linhagem PIM-025, não está associado ao marcador  $Pvr4$  (Figura 1).

No gel de poliacrilamida, 100% das amostras  $F_1$  apresentaram padrão de banda  $Pvr4^+/Pvr4$ , conforme esperado (Tabela 1). No retrocruzamento com o Myr-29-10 ( $F_1RC_1(P_1)$ ), era esperado que 100% das amostras com banda de 444 pb, sendo 50% com uma única banda de 444 pb ( $Pvr4/Pvr4$ ), e 50% com duas bandas, uma de 444 pb e outra de 458 pb ( $Pvr4^+/Pvr4$ ). Foram observadas 22 amostras com uma única banda de 444 pb, num total de 40. Através do teste de qui-quadrado a hipótese de  $\frac{1}{2} Pvr4/Pvr4$  para  $\frac{1}{2} Pvr4^+/Pvr4$  foi aceita ( $P>0.05$ ). No retrocruzamento com o genótipo PIM-025 ( $F_1RC_2(P_2)$ ), 50% das amostras apresentaram marca com padrão de bandas de 444/458 pb ( $Pvr4^+/Pvr4$ ) e 50% apresentaram uma única banda de 458 pb ( $Pvr4^+/Pvr4^+$ ), também conforme esperado (Tabela 3).

Tabela 3 - Proporção observada de amostras associadas ao marcador *Pvr4* nas populações experimentais Myr-29-10 (P<sub>1</sub>), PIM-025 (P<sub>2</sub>), F<sub>1</sub> (P<sub>1</sub> X P<sub>2</sub>), F<sub>1</sub> x P<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> x P<sub>2</sub>, Ikeda, PIM-013, CM-334-INRA, CM-334-UFV, PIM-HE-133, Konan-R, Magali-R e Mallorca.

Tratamento	Freq. Observada			Freq. Esperada			$\chi^2$	
	<i>Pvr4/Pvr4</i>	<i>Pvr4</i> <sup>+</sup> / <i>Pvr4</i>	<i>Pvr4</i> <sup>+</sup> / <i>Pvr4</i> <sup>+</sup>	<i>Pvr4/Pvr4</i>	<i>Pvr4</i> <sup>+</sup> / <i>Pvr4</i>	<i>Pvr4</i> <sup>+</sup> / <i>Pvr4</i> <sup>+</sup>	$\chi^2_c$	$\chi^2_t$
	(444 pb)	(444 pb+458 pb)	(458 pb)	(444 pb)	(444 pb+458 pb)	(458 pb)		
Myr-29-10 (P <sub>1</sub> )	6	-	-	6	-	-	-	-
PIM-025 (P <sub>2</sub> )	-	-	6	-	-	6	-	-
F <sub>1</sub> (P <sub>1</sub> x P <sub>2</sub> )	-	6	-	-	6	-	-	-
F <sub>1</sub> x P <sub>1</sub>	22	18	-	20	20	-	0.4 <sup>ns</sup>	3.8
F <sub>1</sub> x P <sub>2</sub>	-	20	20	-	20	20	-	-
Ikeda	-	-	6	-	-	6	-	-
PIM-013	-	-	6	-	-	6	-	-
CM-334-INRA	21	-	-	21	-	-	-	-
CM-334-UFV	-	-	21	-	-	21	-	-
PIM-HE-133	-	6	-	-	6	-	-	-
Konan-R	-	6	-	-	6	-	-	-
Magali-R	-	-	6	-	-	6	-	-
Mallorca	-	-	6	-	-	6	-	-

P<sub>1</sub>, Linhagem resistente ao PepYMV e apresenta uma banda com 444 pb; P<sub>2</sub>, linhagem resistente ao PepYMV e apresenta uma única banda com 458 pb. <sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de significância.



Considerando a hipótese de segregação independente de dois locos, cada um com dois alelos e com dominância completa, entre as 80 plantas  $F_2$  amostradas é esperada uma proporção de 60 amostras com a banda de 444 pb ( $Pvr4/Pvr4$  e  $Pvr4^+/Pvr4$ ) (Tabela 4). No experimento em questão foi observada uma proporção de 56 amostras com banda de 444 pb ( $Pvr4/Pvr4$  e  $Pvr4^+/Pvr4$ ) num total de 80 (Tabela 4). O teste de Qui-quadrado permitiu concluir que a frequência observada adequou-se à frequência esperada de 3:1, que resultou em um qui-quadrado não significativo ( $P>0.05$ ).

Dessas 56 amostras da geração  $F_2$  com a banda de 444 pb, 14 apresentaram uma única banda de 444 pb ( $Pvr4/Pvr4$ ), e 42 apresentaram duas bandas (uma banda de 444 pb e outra de 458 pb,  $Pvr4^+/Pvr4$ ). O teste qui-quadrado não significativo ( $P>0.05$ ), permitiu concluir que a frequência observada se ajustou à frequência esperada de 1/3 ( $Pvr4/Pvr4$ ) para 2/3 ( $Pvr4^+/Pvr4$ ) (Tabela 4).

Das amostras que apresentaram marca com padrão de banda de 458 pb ( $Pvr4^+/Pvr4^+$ ), é esperado sob a hipótese de não alelismo e genes com segregação independente, 3/4 de plantas resistentes ao PepYMV, e apenas 1/4 suscetíveis. A proporção observada foi 21 plantas resistentes e 3 plantas suscetíveis, para uma proporção esperada era de 18 plantas resistentes para 6 plantas suscetíveis. O teste de qui-quadrado mostrou-se não significativo. Este fato confirma que a resistência ao PepYMV encontrada no genótipo PIM-025 é devida a um gene cuja herança é monogênica, que o alelo que confere resistência é dominante sobre o alelo que confere

suscetibilidade, e que este loco não está ligado ao *Pvr4*, mostrando segregação independente deste último (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados da genotipagem realizada através da utilização do marcador *Pvr4*, referentes à reação de plantas da geração F<sub>2</sub> ao PepYMV.

<b>Genótipos</b>	<b>Descrição</b>	<b>FE</b>	<b>FO</b>	<b><math>\chi^2_c</math></b>
População F <sub>2</sub> (80 plantas)	Com banda 444 pb	3/4	56	1,07 <sup>ns</sup>
	Banda 458 pb somente	1/4	24	
Plantas com banda 444 pb (56 plantas)	Com banda 444 pb somente	1/3	14	1,75 <sup>ns</sup>
	Com banda 444 pb + 458 pb	2/3	42	
Plantas com banda 458 pb somente (24 plantas)	Resistentes ao PepYMV	3/4	21	2,00 <sup>ns</sup>
	Suscetíveis ao PepYMV	1/4	3	

<sup>1</sup> FE - frequência esperada; <sup>2</sup> FO – frequência observada; <sup>ns</sup> não significativo (P > 0.05).

Dos genes da série *pvr* descritos na literatura: *pvr1*; *pvr2*; *pvr3*; *Pvr4*; *pvr5*; *pvr6*; *Pvr7* (Caranta et al. 1999; Grube et al. 2000b; Parrella et al. 2002) e *pvr8* (Arnedo-Andrés et al. 2006), somente *Pvr4* e *Pvr7* são dominantes e estão localizados no cromossomo 10 do pimentão (Caranta et al. 1999; Arnedo-Andrés et al. 2002).

Os resultados do presente trabalho mostram que o alelo de resistência ao PepYMV presente em PIM-025 é dominante, mas não se trata do *Pvr4* e nem do *Pvr7* que está ligado ao *Pvr4*.

Recentemente, Tran et al. (2014) fizeram o *screening* de 99 genes candidatos para a resistência a potyvirus em *Capsicum* spp. e encontraram um gene de resistência que confere resposta de hipersensibilidade ao *Pepper mottle virus* – PepMoV (uma espécie de potyvirus) em *Nicotiniana benthamiana*: dentre os genes candidatos, um ortólogo do gene *Rpi-blb2* em pimentas e pimentão, encontrado em *Capsicum annuum* cv. Floral Gem (suscetível ao PepMoV), denominado RP28, confere resistência à infecção pelo PepMoV em um sistema de expressão transiente em *Nicotiniana benthamiana*. Este gene foi caracterizado molecularmente por Tran et al. (2015), e denominado *Pvr9*.

A posição do *Pvr9* no genoma da pimenta e do pimentão foi predita através do *nucleotide BLAST* contra o banco de dados do genoma de *Capsicum*. A sequência de maior homologia (> 99%), com 4041 pb pertence ao cromossomo 6 em *C. annuum* Zunla-1 e *C. annuum* var. *grabiusculum*. Essa sequência está relacionada com alguns

marcadores já descritos na literatura, como C2At3g25120 (2.1 Mpbs), C2At2g39690 (5.4 Mpbs), C2At3g46780 (9.9 Mpbs), e CVMV-3 (5.4 Mpbs) (Tran et al. 2015).

Segundo Tran et al. (2015), o gene *Pvr9* também foi encontrado na cultivar CM-334 (resistente ao PepMoV). Apesar do teste de resistência ao PepMoV também ter sido realizado nos genótipos de pimentão “Floral Gem” e “CM-334”, o gene só expressou a resposta de hipersensibilidade ao vírus em *N. benthamiana*. Os autores acreditam que o *Pvr9* não se expressa devidamente em *Capsicum* em virtude da ausência de algum fator de mediação que faz o reconhecimento do PepMoV NIB pela proteína Pvr9. O mecanismo de regulação da expressão do gene *Pvr9* ainda não está bem elucidado, além disso o teste de resistência não foi realizado em outras cultivares de pimentão.

Ao que tudo indica, a expressão de resistência ao PepMoV conferida pelo gene *Pvr9* em pimentão é presumivelmente baixa ou nula, já que “Floral Gem.” é considerada suscetível de acordo com Tran et al. (2015). Além disso, este gene de resistência - *Pvr9* - só foi testado para a espécie PepMoV (Tran et al. 2015) e não se sabe até o momento se este gene também confere resistência à espécie PepYMV.

Tendo em vista os relatos sobre os diferentes genes já descritos que conferem resistência a potyvirus em *Capsicum* (Grube et al., 2000a; Arnedo-Andrés et al. 2006; Tran et al. 2015), a resistência do genótipo PIM-025 é provavelmente devida a outro gene da série pvr ainda não descrito na

literatura, o qual poderia ser denominado *Pvr10*, de acordo com Kyle e Palloix (1997).

Neste sentido, os resultados desse trabalho sugerem que novos estudos devem ser realizados para confirmar o controle genético da resistência ao PepYMV, encontrada no genótipo PIM-025. A fonte de resistência de PIM-025 provém do híbrido Magali-R, portanto ambos têm o mesmo gene de resistência. Igualmente, PIM-HE-133 tem como genitor resistente o PIM-025 e também é portador do gene em questão.

#### **4 Conclusão**

O controle genético da resistência ao PepYMV no genótipo resistente PIM-025 é explicada por um alelo dominante, cuja herança é monogênica e segrega independentemente do gene *Pvr4*. No entanto, são necessários novos estudos para identificar se esse gene é o *Pvr9* já descrito, ou outro ainda não descrito. Em caso da segunda hipótese, o mesmo poderia ser denominado *Pvr10*, de acordo com a nomenclatura proposta por Kyle e Palloix (1997).

#### **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Universidade Federal de Lavras (UFLA), à empresa HortiAgro Sementes S.A., à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPQ), e à Financiadora de Estudos e Projetos/Ministério de Ciência e Tecnologia (FINEP/MCT), pelo apoio e oportunidade de realização deste trabalho.

**REFERÊNCIAS**

- Arnedo-Andrés MS, Gil-Ortega R, Luis-Arteaga M, Hormaza JI (2002) Development of RAPD and SCAR markers linked to the Pvr4 locos for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor Appl Genet* 105:1067–1074. doi: 10.1007/s00122-002-1058-2
- Arnedo-Andrés MS, Luis-Arteaga M, Gil Ortega R (2006) New inheritance studies related to Potato Virus Y (PVY) resistance in *Capsicum annuum* L. “Serrano Criollo de Morelos-334”. *Euphytica* 151:95–101. doi: 10.1007/s10681-006-9132-5
- Bento CS, Rodrigues R, Gonçalves LS a, et al (2013) Inheritance of resistance to Pepper yellow mosaic virus in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genet Mol Res* 12:1074–1082. doi: 10.4238/2013.April.10.3
- Caranta C, Thabuis A, Palloix A (1999) Development of a CAPS marker for the Pvr4 locos: a tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genome* 42:1111–1116. doi: 10.1139/gen-42-6-1111
- Carvalho, RC (2013) Obtenção de híbridos de pimentão com resistência a múltiplos patógenos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras.
- Devran Z, Kahveci E, Özkaynak E, et al (2015) Development of molecular markers tightly linked to Pvr4 gene in pepper using next-generation sequencing. *Mol Breed*. doi: 10.1007/s11032-015-0294-5
- Di Dato F, Parisi M, Cardi T, Tripodi P (2015) Genetic diversity and assessment of markers linked to resistance and pungency genes in *Capsicum* germplasm. *Euphytica*. doi: 10.1007/s10681-014-1345-4



- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao use de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA CENARGEN.
- Gonçalves LS a, Rodrigues R, Diz MSS, et al (2013) Peroxidase is involved in pepper yellow mosaic virus resistance in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genet Mol Res* 12:1411–1420. doi: 10.4238/2013.April.26.3
- Grube RC, Blauth JR, Arnedo AMS, et al (2000a) Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus resistance gene cluster in *Capsicum*. *TAG Theor Appl Genet* 101:852–859. doi: 10.1007/s001220051552
- Grube RC, Radwanski ER, Jahn M (2000b) Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae. *Genetics* 155:873–887.
- Hasan R, Huque AKMM, Hossain MK, Alam N (2015) Assessment of genetic divergence in Chilli (*Capsicum annum* L.) genotypes. *Plant Gene Trait* 6:1–5. doi: 10.5376/pgt.2015.06.0003
- Inoue-Nagata a. K, Fonseca MEN, Resende RO, et al (2002) Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. *Arch Virol* 147:849–855. doi: 10.1007/s007050200032
- King A, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (2011) *Virus Taxonomy*, Ninth Repo.
- Kraft KH, Brown CH, Nabhan GP, et al (2014) Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annum*, in Mexico. *Proc Natl Acad Sci* 111:1–6. doi: 10.1073/pnas.1308933111
- Kyle MM, Palloix a. (1997) Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica* 97:183–188. doi: 10.1023/A:1003009721989

- Lucinda N, da Rocha WB, Inoue-Nagata a. K, Nagata T (2012) Complete genome sequence of pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil. *Arch Virol* 157:1397–1401. doi: 10.1007/s00705-012-1313-z
- Mo H, Jang K, Hwang J, et al (2015) Horticultural and chemical quality characterization of accessions selected from four species of *Capsicum*. *Hortic Environ Biotechnol* 56:54–66. doi: 10.1007/s13580-015-0078-0
- Moulin MM, Rodrigues R, Bento CS, et al (2014) Trypsin inhibitors from *Capsicum baccatum* var. *pendulum* leaves involved in Pepper yellow mosaic virus resistance. *Genet Mol Res* 13:9229–9243.
- Nagai H (1983) Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência ao vírus Y. *Horticultu. Brasilia*.
- Nogueira DW, Nogueira DG, Maluf WR, et al (2012) Seleção assistida com uso de marcador molecular para resistência a potyvírus em pimentão. *Pesqui Agropecu Bras* 47:955–963. doi: 10.1590/S0100-204X2012000700012
- Parrella G, Ruffel S, Moretti a., et al (2002) Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon spp.*) and pepper (*Capsicum spp.*) genomes. *Theor Appl Genet* 105:855–861. doi: 10.1007/s00122-002-1005-2
- Revers F, Nicaise V (2014) Plant Resistance to Infection by Viruses. *EncyclLife Sci* 1–10. doi: 10.1002/9780470015902.a0000757.pub3
- Tran P-T, Choi H, Choi D, Kim K-H (2015) Molecular characterization of Pvr9 that confers a hypersensitive response to Pepper mottle virus (a potyvirus) in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 481:113–123. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.052

Tran P-T, Choi H, Kim SB, et al (2014) A simple method for screening of plant NBS-LRR genes that confer a hypersensitive response to plant viruses and its application for screening candidate pepper genes against Peppermottle virus. *J Virol Methods* 201:57–64. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.003

**(VERSÃO PRELIMINAR)**