

LUIZ ARTUR COSTA DO VALLE

**ANÁLISE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS QUE
CONFEREM RESISTÊNCIA A *Phytophthora capsici* EM
'CRIOLLO DE MORELOS 334' (*Capsicum annuum*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

LUIZ ARTUR COSTA DO VALLE

**ANÁLISE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS QUE
CONFEREM RESISTÊNCIA A *Phytophthora capsici* EM
'CRIOLLO DE MORELOS 334' (*Capsicum annum*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 27 de março de 2001

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Conselheiro)

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Conselheiro)

Prof. Kiyoshi Matsuoka

Prof. Eduardo S. Gomide Mizubuti

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Material vegetal.....	6
2.2. Isolamento e determinação do grupo de compatibilidade sexual de <i>Phytophthora capsici</i>	7
2.3. Produção de inóculo.....	9
2.4. Comparação de diferentes concentrações de inóculo para a avaliação da resistência a <i>P. capsici</i> no colo e raízes.....	9
2.5. Avaliação da resistência a <i>P. capsici</i> na parte aérea.....	10
2.6. Avaliação da resistência em progênies de cruzamentos de CM334 com as linhagens L-3513 e L-3436 e com o cultivar California Wonder	11
2.6.1. Avaliação dos híbridos F ₁	11
2.6.2. Avaliação das gerações F ₂ e retrocruzamentos.....	12
2.7. Obtenção dos marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”).....	13
2.7.1. Extração de DNA.....	13

2.7.2. Ensaio RAPD.....	14
2.8. Triagem de “primers”.....	15
2.9. População de mapeamento.....	15
2.10. Análise de ligação.....	15
2.11. Avaliação de doença em famílias F ₃	17
2.12. Análise de QTLs.....	19
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Resistência de Criollo de Morelos 334, L-3513, L-3436 e California Wonder a <i>Phytophthora capsici</i> sob diferentes concentrações de inóculo aplicadas ao solo.....	21
3.2. Avaliação de resistência a <i>P. capsici</i> por atomização da parte aérea.....	23
3.3. Avaliação da resistência em progênies de cruzamentos de CM334 com as linhagens L-3513 e L-3436 e com o cultivar California Wonder	26
3.3.1. Avaliação dos híbridos F ₁	26
3.3.2. Avaliação das gerações F ₂ e retrocruzamentos.....	29
3.4. Polimorfismo genético entre o acesso resistente não-domesticado Criollo de Morelos 334, a linhagem L-3436 e o cultivar California Wonder	33
3.5. Análise de ligação.....	34
3.6. Avaliação de doença nas famílias F ₃ derivadas das plantas F ₂ da população de mapeamento.....	43
3.7. Análise de QTLs.....	43
3.8. Possibilidades de predição da sobrevivência das famílias F ₃ com base no fenótipo molecular das plantas F ₂	54
4. DISCUSSÃO.....	61
4.1. Resistência dos parentais a <i>P. capsici</i>	61
4.2. Avaliação da resistência em progênies de cruzamentos de CM334 com as linhagens L-3513 e L-3436 e com o cultivar California Wonder	65
4.3. Polimorfismo entre CM334 e variedades de pimentão doce.....	67

4.4. Análise de ligação.....	68
4.5. Famílias transgressivas.....	71
4.6. Análise de QTLs.....	71
4.7. Seleção assistida por marcadores.....	74
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

RESUMO

VALLE, Luiz Artur Costa do, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001.
Análise genética e identificação de regiões genômicas que conferem resistência a *Phytophthora capsici* em ‘Criollo de Morelos 334’ (*Capsicum annuum*).
Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Acelino Couto Alfenas e Carlos Roberto de Carvalho.

Com o objetivo de estudar o efeito do parental suscetível e a genética da resistência de ‘Criollo de Morelos 334’ (CM334) a *P. capsici* por meio de análise mendeliana e mapeamento de QTLs (“Quantitative trait loci”), duas linhagens, L-3436 e L-3513, e um cultivar, California Wonder (CW), foram utilizados em cruzamentos com CM334. Experimentos de inoculação com suspensões de zoósporos aplicadas ao solo ou atomizadas na parte aérea das plantas confirmaram a resistência de CM334 e revelaram o seguinte gradiente de suscetibilidade, do mais para o menos suscetível: L-3513 > CW > L-3436. Em experimentos de inoculação via solo, esse mesmo gradiente foi observado para os híbridos F₁ entre CM334 e esses três parentais bem como para as respectivas gerações F₂ e retrocruzamentos, evidenciando a importância do parental recorrente no melhoramento para incorporação de resistência a *P. capsici*. Segregações observadas em inoculações em bandejas não puderam ser explicadas por nenhum dos modelos genéticos sugeridos previamente para a resistência de CM334 a *P. capsici*. Em plantas inoculadas individualmente em copos plásticos de 500 mL, entretanto, os resultados ajustaram-se a um modelo de herança com dois genes dominantes independentes para o cruzamento entre L-3436 e CM334, cada um herdado de um dos parentais, sugerindo que as condições de inoculação tem grande efeito sobre os resultados. Uma população de 114 plantas F₂ do cruzamento entre L-3436 e CM334 foi utilizada para a análise de ligação a partir de 174 marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), distribuídos em dois mapas contendo cada um apenas marcadores em fase de acoplamento, com cobertura total de pelo menos 497 cM. As 114 famílias F₃ colhidas nessas plantas foram utilizadas para a avaliação de resistência no colo e raízes em três experimentos independentes, apresentando distribuições aproximadamente contínuas de valores de porcentagem de sobrevivência. Algumas famílias transgressivas foram mais resistentes

que CM334. A análise de QTLs revelou regiões significativamente associadas a resistência em pelo menos dois experimentos nos grupos de ligação 2C e 2L, 4L, 10C, 11C e 11L, explicando individualmente de 9,4 a 24% da variância fenotípica de acordo com a análise de regressão linear simples ou de 9,2 a 65,4% de acordo com o mapeamento de intervalo no programa MAPMAKER/QTL 1.1. Outras quatro regiões foram significativas em apenas um dos experimentos. Detectaram-se QTLs originários de CM334 e de L-3436, confirmando a contribuição de ambos os parentais para a resistência. Várias plantas resistentes da população de mapeamento puderam ser selecionadas com base nos fenótipos moleculares dos marcadores significativos nos grupos 2C, 11L, 4L e 10C.

ABSTRACT

VALLE, Luiz Artur Costa do, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March of 2001.
Genetic analysis and identification of genomic regions associated with resistance to *Phytophthora capsici* in ‘Criollo de Morelos 334’ *Capsicum annuum*) Adviser: Sérgio Herminio Brommonschenkel. Committee Members: Acelino Couto Alfenas and Carlos Roberto de Carvalho.

In order to evaluate the effect of different genetic backgrounds on the resistance to *P. capsici*, to study the inheritance of the resistance and to identify QTLs contributing to resistance, two bell pepper lines, L-3513 and L-3436, and one cultivar, California Wonder (CW), were crossed to one line of the resistant *Capsicum annuum* introduction ‘Criollo de Morelos 334’ (CM334). The resistance of CM334 was confirmed in inoculations made by distributing zoospore suspensions near the base of the plants or by spraying them on the leaves and stems. A gradient of susceptibility with L-3513 > CW > L-3436, from the most to the least susceptible, was observed among the other parents. The same gradient was observed on the F₁ hybrids between CM334 and these three varieties and also on the corresponding F₂ and backcrosses, showing the importance of the recurrent parent on breeding for resistance to *P. capsici*. Segregation ratios observed in experiments in plastic trays did not fit to any of the inheritance models previously proposed to explain the genetics of the resistance of CM334 to *P. capsici*. When plants were inoculated individually in plastic pots of 500 mL, an inheritance model with two dominant genes, each one inherited from one of the parents, explained the results observed for the cross L-3436 x CM334, suggesting that inoculation conditions have a great effect on the results. A mapping population of 114 F₂ plants from the cross L-3436 x CM334 was used for linkage analysis of 174 RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers, which were separated in two coupling-phase maps covering 497 cM of pepper genome. Root and crown resistance of each of the 114 F₂ plants from the mapping population was evaluated in three independent inoculations of the respective selfed F₃ lines, resulting in nearly continuous frequency distributions for values of percent of survival. Transgressive F₃ lines showing percents of survival higher

than that observed in CM334 were detected. QTL analysis uncovered regions consistently contributing to resistance in linkage groups 2C e 2L, 4L, 10C, 11C e 11L, each explaining alone 9,4 to 24% of total phenotypic variance according to simple regression analysis or 9,2 to 65,4% according to interval analysis performed by MAPMAKER/QTL 1.1. QTLs from L-3436 and CM334 were detected, confirming the important contribution of both parents to the resistance. Many resistant plants from the mapping population could be selected by their molecular phenotype for significative markers on linkage groups 2C, 11L, 4L e 10C.

1. INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L. var *annuum*) é uma das 10 espécies de hortaliças mais plantadas em todo o mundo (REIFSCHNEIDER, 2000) e a terceira mais cultivada nos países em desenvolvimento, após a batata e o tomate (FAO PRODUCTION YEARBOOK, 1997). A área cultivada com essa hortaliça no Brasil foi estimada em 7.400 ha/ano no biênio 1997/1998. O estado de Minas Gerais apresentou a segunda maior área plantada, com 1.300 ha, que corresponderam a 17,6% do total (Ishikawa, 1998, citado por KOBORI, 1999). Considerando também as pimentas do gênero *Capsicum*, REIFSCHNEIDER (2000), embora enfatize a carência de dados estatísticos confiáveis sobre essas culturas no Brasil, estimou a área plantada no país em 15.000 ha, com uma receita anual de 79 milhões de reais.

Avanços consideráveis em produtividade e qualidade na cultura do pimentão foram conseguidos por meio do aprimoramento das práticas culturais e pelo melhoramento genético. A incorporação de resistência a doenças importantes, como o mosaico do pimentão (NAGAI, 1983) e meloidoginoses (MALUF, 1997), representaram grandes conquistas do melhoramento. Outras doenças, entretanto, permanecem como um desafio para os melhoristas. Dentre estas, a murcha ou requeima do pimentão causada por *Phytophthora capsici* Leonian, considerada a doença mais importante dessa cultura (REIFSCHNEIDER, 2000), destaca-se por sua ampla distribuição geográfica, por seu alto potencial de dano e por seu difícil controle (MATSUOKA, 1984; KUROZAWA e PAVAN, 1997; RISTAINO e JOHNSTON, 1999).

O primeiro relato dessa doença ocorreu no Estado do Novo México, Estados Unidos, em 1922 (LEONIAN, 1922). No Brasil, foi relatada pela primeira vez em São Paulo, em 1952 (AMARAL, 1952). *Phytophthora capsici* pode infectar todos os órgãos da planta de pimentão, causando podridão da raiz e do colo, lesões negras no caule, lesões circulares amarronzadas e encharcadas em folhas e podridão de frutos, estes últimos comumente cobertos por esporângios do patógeno. A doença inicia-se no campo por meio da infecção das raízes pelo inóculo primário presente no solo, progredindo para

infecção do coleto. Os sintomas típicos da doença no campo são a podridão de raízes, murcha repentina, necrose de coloração marrom-escura na altura do colo e morte da planta. Sob condições de alta umidade, o patógeno esporula na superfície do colo das plantas infectadas, produzindo esporângios que podem originar ciclos secundários de doença se transportados por escoamentos superficiais de água. Lesões em caules, folhas e frutos são observadas quando o inóculo é transportado por respingos de água até a parte aérea. A doença é favorecida por excesso de umidade no solo, causada por períodos prolongados de chuva, irrigação excessiva e solos mal drenados, e por temperaturas elevadas (22-29°C). Em áreas infestadas com condições de ambiente favoráveis à doença, as plantas podem ser infectadas em qualquer estágio de desenvolvimento e o cultivo do pimentão é comumente inviabilizado (MATSUOKA, 1984; KUROZAWA e PAVAN, 1997; RISTAINO e JOHNSTON, 1999).

A adoção de práticas que reduzam o acúmulo de água no solo, evitando condições conducivas à doença, é fundamental para o controle da murcha ou requeima causadas por *P. capsici*. Sob condições favoráveis de ambiente, o uso de fungicidas pode não ser suficiente para impedir a ocorrência de epidemias (RISTAINO e JOHNSTON, 1999). A ocorrência de isolados de *P. capsici* resistentes ao principal fungicida recomendado para o controle da podridão de raízes e coleto, o metalaxyl, bem como ao seu componente ativo, mefenoxam, relatados nos últimos anos, representa outro entrave ao controle químico (PARRA e RISTAINO, 1998; PENNISI et al., 1998; LAMOUR e HAUSBECK, 2000; MATHIS et al., 1999). Como o controle da umidade do solo é comumente muito difícil em cultivos sem proteção na época chuvosa e considerando os problemas associados ao uso de fungicidas, a utilização de resistência genética constitui uma importante alternativa para o controle de *P. capsici*.

Várias fontes de resistência foram relatadas em *Capsicum* (KIMBLE e GROGAN, 1960; GUERRERO-MORENO e LABORDE, 1980; MATSUOKA et al., 1984; BANJA, 1989). A genética da resistência a *P. capsici* em *C. annum* foi estudada principalmente para as fontes de resistência PI201232 e PI201234 (KIMBLE e GROGAN, 1960), originárias da América Central, e as mexicanas 'Linea 29' (L-29) e 'Criollo de Morelos 334' (CM334) (GUERRERO-MORENO e LABORDE, 1980).

Outras fontes de resistência foram estudadas por SARAIVA (1982), BANJA (1989) e LEFEBVRE e PALLOIX (1996).

SARAIVA (1982) propôs que a resistência à infecção no caule e na raiz em cinco acessos de *C. annuum* do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (BGH 176 – ‘Santaka’, BGH 2678 – ‘Floral Gem’, BGH 3032 – ‘Chirozle’, BGH 3036 – ‘Cubano Amarillo’ e BGH 3056 – ‘Mirasol’) seria controlada por dois genes recessivos, influenciados por um gene modificador dominante. BANJA (1989) estudou a herança da resistência em planta adulta da Pimenta Ornamental Picante (*C. annuum*) e concluiu que havia dois genes envolvidos na resistência, com epistasia dominante e recessiva. Testes de alelismo levaram o autor a sugerir o mesmo controle genético para as fontes de resistência ‘Criollo de Morelos’ (BG 003883), ‘Cubano Amarillo’ (BG 003886) e ‘Santaka’ (BG 003891). No cultivar indiano com resistência parcial ‘Perennial’, estudos de mapeamento de QTLs (locos que controlam características quantitativas – “Quantitative Trait Loci”) revelaram dois locos de efeito maior explicando de 41 a 55% e de 19 a 25% da variância fenotípica de acordo com o critério de avaliação de resistência considerado, além de outros locos de menor efeito e locos com ação epistática, incluindo alguns com origem no progenitor suscetível ‘Yolo Wonder’ (LEFEBVRE e PALLOIX, 1996).

Estudos genéticos em linhagens resistentes derivadas de PI201232 e PI201234 realizados por SMITH et al. (1967) sugeriram que a resistência era controlada por um ou dois genes dominantes independentes, dependendo da linhagem analisada. Modo de herança semelhante foi relatado para a resistência de outras linhagens selecionadas em PI201234, como ‘Phyo 636’, com dois genes dominantes (Pochard e Chambonet, 1972, citados por GIL ORTEGA et al., 1992) e ‘Fyuco’ e ‘P51’, com um gene dominante (BARKSDALE et al., 1984). Entretanto, GIL ORTEGA et al. (1990a) propuseram três genes, com pelo menos dois deles em homozigose para os alelos de resistência, como responsáveis pela resistência de PI201232 e PI201234 a *P. capsici*. Modo de herança semelhante foi proposto para ‘L-29’, mas nesse caso foram sugeridos quatro alelos de resistência em qualquer arranjo nos três genes (GIL ORTEGA et al., 1990b). Estudos genéticos visando elucidar a herança da resistência em CM334 apresentaram resultados variáveis, tendo sido sugeridos modelos com dois genes recessivos (GUERRERO-MORENO e LABORDE, 1980), três genes, sendo necessária a condição heterozigótica nos três ou pelo menos quatro alelos de resistência em qualquer arranjo para expressar a resistência (GIL-ORTEGA et al., 1991), dois genes com epistasia dominante e recessiva

(REIFSCHNEIDER et al., 1992), um gene dominante ou dois genes dominantes complementares dependendo do progenitor suscetível utilizado (WALKER e BOSLAND, 1999). Estudos utilizando a técnica de BSA (“Bulked Segregant Analysis”, MICHELMORE et al., 1991) associada a marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”, WILLIAMS et al., 1990) detectaram apenas uma região genômica de grande efeito sobre a resistência de CM334 a *P. capsici* (MASSOUDI e CANTRELL, 1996; PRINCE et al., 2001).

‘Criollo de Morelos – 334’ produz frutos pequenos e pungentes, com dimensões médias de 4,4 cm de comprimento e 1,7 cm de diâmetro (KOBORI, 1999). Apesar das divergências quanto ao controle genético da resistência, CM334 consistentemente tem se apresentado como a mais efetiva dentre as fontes de resistência a *P. capsici* comumente utilizadas (GUERRERO-MORENO e LABORDE, 1980; PALLOIX et al., 1990; GIL-ORTEGA et al., 1991, 1992, 1995; KOBORI, 1999). Benefícios adicionais da sua utilização em programas de melhoramento de pimentão incluem a possibilidade de selecionar também para resistência a PVY e nematóides de galhas do gênero *Meloidogyne*, pois CM334 apresenta resistência de amplo espectro a PVY, conferida pelo gene dominante *Pvr-4* (KYLE e PALLOIX, 1997), e resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (DJIAN-CAPORALINO et al., 1999). Desta forma, este trabalho teve por objetivos avaliar se a resistência a *P. capsici* derivada de ‘Criollo de Morelos 334’ seria afetada por cruzamentos com três variedades de pimentão que apresentaram diferentes níveis de resistência a esse patógeno, estudar a genética da resistência nesses três cruzamentos por meio de análise mendeliana e identificar regiões genômicas significativamente associadas à resistência no cruzamento com a linhagem parcialmente resistente ‘L-3436’, por meio de mapeamento de QTLs com marcadores RAPD.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos aqui apresentados foram realizados em laboratórios, casas-de-vegetação e telado com cobertura de vidro do Departamento de Fitopatologia (DFP) e do Instituto de Biotecnologia (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.1. Material vegetal

O acesso mexicano de *C. annuum* de frutos pequenos e pungentes 'Criollo de Morelos 334' (CM334), resistente a *P. capsici*, um cultivar, 'California Wonder' (CW), e duas linhagens, L-3436 e L-3513, de frutos grandes e doces, estas últimas empregadas para a produção de um híbrido comercial, foram utilizados neste trabalho. A linhagem de CM334 foi obtida junto ao Departamento de Pesquisa da Agroflora/Sakata, Bragança Paulista – SP. As linhagens L-3436 e L-3513 foram provenientes da Hortices/Seminis, Igarapé – MG. A linhagem L-3436 apresenta baixo nível de resistência a *P. capsici* (LEITE, 1999), enquanto a linhagem L-3513 e o cultivar California Wonder são suscetíveis.

Foram realizados cruzamentos entre a linhagem resistente CM334 e as linhagens L-3436, L-3513 e o cultivar CW, obtendo-se os híbridos F₁ e recíprocos, gerações F₂ e os retrocruzamentos com os respectivos

progenitores, nos dois sentidos. Detalhes sobre os experimentos utilizando esses cruzamentos são fornecidos nos itens correspondentes.

2.2. Isolamento e determinação do grupo de compatibilidade sexual de *Phytophthora capsici*

Os isolados utilizados neste trabalho encontram-se listados no Quadro 1. Os isolados Phc-1 e Phc-2 foram isolados por meio de plaqueamento de fragmentos de tecido infectado, retirados nas margens da área lesionada, em placas de Petri com meio seletivo cuja composição é apresentada no Quadro 2. O isolado UFV-T, obtido de um fruto de tomate infectado, foi utilizado por LEITE (1999) e mantido no Laboratório de Patologia Florestal/Genética da Interação Planta-Patógeno, BIOAGRO- UFV.

Para a determinação do grupo de compatibilidade sexual utilizaram-se isolados de *Phytophthora infestans* dos grupos A1 e A2, pertencentes às linhagens clonais US-1 e US-8, respectivamente (FRY e GOODWIN, 1997). Efetuou-se o pareamento destes com os isolados de *P. capsici* em meio cenoura-ágar (água do cozimento de 200 g de cenoura, 17 g de ágar, água destilada suficiente para completar 1 L), a 20°C, no escuro. Os isolados de *P. infestans* crescem mais lentamente que os de *P. capsici*. Em função disso, os isolados de *P. infestans* foram colocados para crescer sempre 15 dias antes dos de *P. capsici*, transferindo para um dos lados de placas com meio cenoura-ágar uma faixa retangular de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) de 3-4 cm de comprimento e 0,3 cm de espessura com crescimento micelial. Após 15 dias, transferiu-se um fragmento pequeno de meio BDA com crescimento micelial de *P. capsici* para o outro lado das placas. As placas foram observadas aos 8-10 dias após o pareamento, sob microscópio estereoscópico e sob microscópio óptico comum, na região de encontro das duas colônias, para verificar se havia formação de oósporos. A formação abundante de oósporos indica que os isolados são de grupos de compatibilidade sexual diferentes. A ausência destes indica que os isolados pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade sexual. Para a confirmação dos resultados, efetuou-se também

Quadro 1 – Isolados de *Phytophthora capsici* utilizados no presente trabalho com as respectivas origens e grupos de compatibilidade sexual (“mating type”)

Isolado	Origem	Grupo de Compatibilidade Sexual (“Mating type”)
Phc-1	Fruto de pimentão coletado em supermercado de Viçosa	A2
Phc-2	Planta adulta de pimenta coletada na Horta Velha da UFV	A1
UFV-T	Fruto de tomate coletado no comércio de Viçosa	A1

Quadro 2 – Meio seletivo utilizado para o isolamento de *P. capsici* (MITCHELL e KANNWISCHER-MITCHEL, 1992)

Cornmeal agar Difco	17 g
Água destilada	1 L
Pimaricina ¹	10 mg
Vancomicina ¹	100 mg
Ampicilina ¹	100 mg
Hymexazol ^{1,2}	50 mg
PCNB ^{1,2}	100 mg

¹Valores correspondem à quantidade de ingrediente ativo.

²Recomendados apenas para isolamentos a partir de solo ou raízes.

o pareamento dos isolados de *P. capsici* entre si, em cenoura ágar, como descrito acima. Com base nos resultados dos pareamentos, determinou-se o grupo de compatibilidade sexual dos três isolados (Quadro 1).

2.3. Produção de inóculo

A produção de inóculo foi realizada de acordo com URBEN (1980). Os isolados foram cultivados em meio suco de tomate-ágar (200 mL de suco de tomate Superbom, 3g de carbonato de cálcio, 17 g de ágar e 800 mL de água destilada), a 28°C, sob luz contínua, por 7 dias. A seguir, adicionaram-se 10-15 mL de água destilada por placa e efetuou-se uma leve raspagem com alça de Drigalsky para destacar os esporângios. Para a liberação de zoósporos, a suspensão de esporângios destacados foi deixada em temperatura ambiente por uma hora e então filtrada em lenço de papel. Uma alíquota do filtrado foi retirada e agitada em Vortex por um minuto para paralisar o movimento dos zoósporos. A seguir, determinou-se a concentração por meio de contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem, ajustou-se o volume para a concentração desejada adicionando-se água destilada.

2.4. Comparação de diferentes concentrações de inóculo para a avaliação da resistência a *P. capsici* no colo e raízes

CM334, L-3436, L-3513 e Califórnia Wonder foram semeados em bandejas plásticas com dimensões internas de 39 x 27 x 10 cm, com uma linha de cada variedade por bandeja, 40 sementes/linha. Utilizou-se como substrato uma mistura de solo, areia e esterco bovino curtido na proporção de 3:1:1. Quando necessário, eliminaram-se as plantas que germinaram tardiamente para evitar a inoculação de plantas menos desenvolvidas. Utilizou-se uma mistura de zoósporos dos três isolados de *P. capsici* nas concentrações de 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 ou 5×10^4 zoósporos/mL. As plantas foram inoculadas aos 30 dias após a semeadura, distribuindo-se 40 mL de suspensão de zoósporos por linha de plantio no solo junto ao coleto das plantas. O delineamento empregado foi o de parcelas subdivididas com duas repetições, com concentrações de inóculo nas parcelas (parcela = bandeja com uma linha de plantio de cada variedade) e variedades nas subparcelas (subparcela = linha de plantio). Registrou-se a incidência de necrose no coleto e de murcha dos três aos 16 dias após a inoculação (d.a.i.), a cada um ou dois dias. Esse experimento foi conduzido em telado do DFP/UFV.

2.5. Avaliação da resistência a *P. capsici* na parte aérea

Avaliou-se a resistência da parte aérea por meio de atomização de suspensão de zoósporos em toda a planta, como descrito por BARKSDALE et al. (1984) e MATSUOKA et al. (1984). Testaram-se duas concentrações de inóculo, 10^3 e 10^4 zoósporos/mL. Plantas de CM334, de L-3513 e de L-3436, cultivadas em vasos com capacidade para 1 L de solo, foram inoculadas aos 30 dias após a semeadura. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (duas concentrações x três variedades) e quatro repetições (uma repetição = um vaso com duas plantas). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro, a 25°C, por 48 h, após o que foram transferidas para telado, onde foram mantidas até os 21 d.a.i., realizando-se avaliações periódicas de incidência de doença.

Outras duas inoculações foram realizadas, desta feita com as plantas em bandejas, uma linha de cada variedade por bandeja, como descrito no item 2.4, em um delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (variedades) e duas repetições (linhas de plantio). No experimento 1, as plantas foram inoculadas aos 40 dias após a semeadura, e no experimento 2, aos 53 dias. As plantas foram avaliadas individualmente até os 17 d.a.i. (experimento 1, cinco avaliações) ou 15 d.a.i. (experimento 2, quatro avaliações), de acordo com a escala descritiva apresentada abaixo:

0 – Sem sintomas;

1 – Infecção limitada ao ápice, com uma a três folhas jovens apicais necrosadas; ou uma lesão em folha madura; ou uma lesão pequena no caule por planta;

2 – Lesão nas folhas apicais e até uma lesão em folhas maduras por planta; ou até duas lesões em folhas ou no caule, desde que pequenas neste último caso;

3 – Ápice necrosado, mais de duas lesões não-apicais por planta, presença de folhas pendentes devido à infecção no pecíolo, comumente com lesões no caule;

4 – Anelamento do caule por lesão circundante iniciada no próprio caule, em folhas maduras ou em folhas apicais, com conseqüente tombamento da parte superior à região anelada;

5 – Planta morta.

A média das notas na linha de plantio correspondente foi utilizada como nota da repetição.

2.6. Avaliação da resistência em progênies de cruzamentos de CM334 com as linhagens L-3513 e L-3436 e com o cultivar California Wonder

2.6.1. Avaliação dos híbridos F₁

Foram realizados quatro experimentos de inoculação para a avaliação da resistência dos híbridos entre CM334 e as variedades de frutos grandes e doces. Os experimentos foram realizados em bandejas, como descrito anteriormente (item 2.4), com o mesmo método de inoculação. Foram realizadas avaliações a cada dois dias a partir do terceiro dia após a inoculação, registrando-se o número de plantas com os sintomas típicos da doença. Esses experimentos foram realizados em casas-de-vegetação do DFP/UFV.

Em dois desses experimentos, utilizou-se apenas o isolado UFV-T, na concentração de 10^4 zoósporos/mL. Ambos foram inoculados aos 30 dias após a semeadura. No primeiro, avaliaram-se apenas o híbrido CM334 x CW e os respectivos parentais, em uma bandeja com uma linha (30 sementes / linha) de cada. Esse experimento foi avaliado até os 10 dias após a inoculação. No segundo experimento, além destes, incluíram-se também o recíproco (CW x CM334), L-3436 e os híbridos F₁ CM334 x L-3436 e L-3436 x L-3513 (sementes comerciais deste último). As quatro bandejas que compuseram o experimento (quatro linhas/bandeja, 30 sementes/linha) receberam uma linha de CW como testemunha suscetível. Duas linhas de cada um dos demais tratamentos foram casualizadas entre as bandejas. Foram realizadas avaliações até os 20 dias após a inoculação.

Em outros dois experimentos foi utilizada a mistura de isolados descrita no item 2.4 na concentração de 5×10^4 zoósporos/mL. No primeiro, para cada cruzamento (CM334 x L-3436, L-3513 ou CW), foram casualizadas, em duas bandejas, uma linha de cada um dos dois parentais e uma linha de cada um dos respectivos híbridos F₁

recíprocos por bandeja, em um total de quatro linhas por bandeja, com 40 sementes por linha. Além dessas seis bandejas, uma bandeja adicional com três linhas (L-3513, L-3436 e o híbrido comercial entre eles) foi incluída. As bandejas foram também casualizadas. A inoculação foi realizada aos 46 dias após a semeadura e a avaliação prolongou-se até os 15 dias após a inoculação. O outro experimento foi uma repetição deste, sem a bandeja adicional para o híbrido entre L-3436 e L-3513. A inoculação foi efetuada aos 55 dias após a semeadura.

2.6.2. Avaliação das gerações F₂ e retrocruzamentos

Foram realizados dois experimentos em bandejas, conforme descrito no item 2.4, com as gerações de retrocruzamentos e F₂ originadas dos cruzamentos entre CM334 e os três outros parentais. Ambos foram realizados em casa-de-vegetação do DFP/UFV. No experimento 1, para cada cruzamento, foram semeadas em duas bandejas por geração, três linhas da respectiva geração e uma linha de um dos parentais envolvidos no cruzamento em cada bandeja, totalizando 18 bandejas. As plantas foram inoculadas aos 45 dias após a semeadura com uma suspensão a 5×10^4 zoósporos/mL da mistura de isolados, conforme descrito no item 2.4. Foram realizadas avaliações até os 14 dias após a inoculação.

No experimento 2, além das gerações avaliadas no experimento anterior, incluíram-se também os híbridos F₁. Para cada cruzamento, linhas das gerações F₁, F₂, retrocruzamento com CM334 e retrocruzamento com o outro parental (L-3436, L-3513 ou CW) foram casualizados em um conjunto de duas bandejas, cada uma com uma linha de cada um dos pais. Assim, além dos pais, cada bandeja recebeu duas gerações e cada conjunto, as quatro gerações. Foram semeados quatro conjuntos destes para cada cruzamento, totalizando no experimento 12 conjuntos e 24 bandejas, que foram também casualizadas. As plantas foram inoculadas aos 36 dias após a semeadura com uma suspensão a 10^4 zoósporos/mL do isolado Phc-1, de acordo com o método descrito no item 2.4. Em razão das altas incidências de doença observadas a partir de dois dias após a inoculação, as avaliações prolongaram-se apenas até os oito dias.

Outro experimento em bandejas foi realizado da mesma forma que o experimento 2, porém somente com as progênies do cruzamento entre CM334 e L-3436. Oito conjuntos semeados conforme descrito para o experimento 2 foram inoculados aos 36 dias após a semeadura, com suspensão de 5×10^4 zoósporos/mL da mistura de isolados (item 2.4), sendo avaliados até os 11 dias após a inoculação.

Realizou-se um experimento com plantas mantidas individualmente em copos plásticos de 500 mL apenas com as progênies do cruzamento entre CM334 e L-3436. Sementes das gerações parentais, F₁, F₂ e retrocruzamentos foram semeadas em bandejas e, após 15 dias, transplantadas para copos plásticos contendo a mistura descrita no item 2.4. Foram realizadas duas inoculações, uma aos 44 e outra aos 57 dias após a semeadura, mediante a aplicação ao solo ao redor do coleto das plantas de 3 mL de uma suspensão com 10^4 zoósporos/mL do isolado Phc-1. A incidência de necrose do coleto e murcha foi registrada até os 30 dias após a primeira inoculação.

2.7. Obtenção dos marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”)

2.7.1. Extração de DNA

A extração de DNA genômico total dos progenitores e das plantas F₂ foi realizada de acordo com FULTON et al. (1995), a partir de folhas jovens, não completamente expandidas, coletadas poucos minutos antes da extração. Quatro discos de tecido foliar por amostra, com diâmetro de 6 mm, foram macerados em tubo de microcentrifuga contendo 250 µL de tampão de extração (25 partes do tampão A - Sorbitol 350 mM, Tris-base 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5; 25 partes do tampão B - Tris 200mM, EDTA 50mM, NaCl 2M, CTAB 2%; 10 partes de Sarcosil 5% e 0,15% (p/v) de bissulfito de sódio), utilizando furadeira elétrica. Adicionaram-se mais 500 µL de tampão de extração aos macerados obtidos, que foram então mantidos em banho-maria a 65°C por uma hora. A seguir, adicionaram-se 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) por tubo e efetuou-se uma centrifugação a 10.000 rpm, em

microcentrífuga Eppendorf[®], por 5 minutos. A fase aquosa de cada amostra foi transferida para tubos novos, aos quais adicionou-se igual volume de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. Após suave agitação por cerca de três minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e lavaram-se os precipitados (“pellets”) resultantes duas vezes com etanol 70%. O DNA foi seco ao ar e ressuspendido em 50 µL de TE + RNase (10 ng/µl).

As concentrações de DNA foram estimadas por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1x, por comparação da intensidade de fluorescência das bandas das amostras com a de padrões de quantidade conhecida obtidas pela diluição de DNA de fago λ.

2.7.2. Ensaio RAPD

As reações de amplificação foram conduzidas de acordo com WILLIAMS et al. (1990), com as modificações sugeridas por FERREIRA e GRATAPAGLIA (1996), em volume total de 13 µl contendo 10 mM de tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 15 ng de oligonucleotídeo iniciador (“primer”) de 10 bases (“Operon Technologies Inc.”, Alameda, CA, EUA), 10-15 ng de DNA genômico e uma unidade de *Taq*-DNA polimerase por reação. As reações foram realizadas em placas de poliestireno com 96 cavidades, utilizando termocicladores modelo PT-100 da MJ Research. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa de desnaturação a 92°C por um minuto, uma etapa de ligação do “primer” ao DNA molde a 35°C por um minuto e uma etapa de extensão a 72°C por dois minutos. Após 40 ciclos, realizava-se uma etapa adicional de extensão a 72°C, por sete minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,4%) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TBE 1x. As imagens foram capturadas e armazenadas em sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

2.8. Triagem de “primers”

Para identificar polimorfismos genéticos entre o acesso resistente ‘CM 334’ e as variedades domesticadas L-3436 e Califórnia Wonder, foram testados 917 oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) das séries OP-A a OP-Z e OP-AA a OP-AX (Operon Tech., Alameda, CA) e avaliaram-se as diferenças quanto à presença/ausência de bandas entre as três variedades.

2.9. População de mapeamento

A população de mapeamento foi constituída por 114 plantas F_2 originadas da autofecundação de uma mesma planta F_1 do cruzamento entre L-3436 e CM334. Colheram-se as sementes de autofecundação dessas plantas F_2 , que originaram as famílias F_3 nas quais foram realizadas as avaliações de doença. Desta forma, obteve-se um dado quantitativo (porcentagem de sobrevivência da F_3) para cada planta F_2 e pôde-se repetir essa avaliação no tempo.

2.10. Análise de ligação

Utilizaram-se “primers” que geraram polimorfismos nítidos na triagem para a amplificação de marcadores RAPD segregantes na população de mapeamento. Os marcadores foram avaliados quanto à presença ou ausência em cada planta F_2 . A segregação de cada marcador, de acordo com a proporção 3:1 (presença:ausência), esperada para um marcador dominante, foi avaliada por meio de testes qui-quadrado ($P < 0,05$) com um grau de liberdade. Quando um mesmo “primer” amplificava fragmentos polimórficos distintos nos dois progenitores, ambos segregavam na população de mapeamento e não eram detectados recombinantes sem os dois fragmentos, estes eram avaliados conjuntamente e testava-se a conformidade da segregação desse novo marcador com a hipótese 1:2:1 (presença/ausência : presença/presença :

ausência/presença) por meio de teste qui-quadrado ($P < 0,05$) com dois graus de liberdade. Quando se aceitava a hipótese 1:2:1, o marcador passava então a ser analisado como um marcador codominante. Os marcadores RAPD foram identificados pelo código do “primer” seguido do tamanho do fragmento em pares de bases, exceto aqueles analisados como codominantes, que foram identificados com o código do “primer” seguido da abreviação “cod”.

Em razão de marcadores dominantes em fase de repulsão frequentemente provocarem erros nas estimativas de frequência de recombinação e na ordenação dos locos (KNAPP et al., 1995), optou-se por separar os dados genotípicos em dois conjuntos de marcadores em fase de acoplamento, conforme recomendam KNAPP et al. (1995) e BRADSHAW et al. (1998). Um conjunto representou o genoma de L-3436, sendo constituído por marcadores dominantes que se mostraram homozigotos recessivos, ou seja, não amplificados, em L-3436, e o outro, composto por marcadores dominantes que se mostraram homozigotos recessivos em CM334, representou o genoma de CM334. Os marcadores codominantes foram incluídos nos dois conjuntos.

Utilizou-se o programa MAPMAKER/EXP 3.0 (LINCOLN et al., 1992a) para a construção dos mapas de ligação. Os marcadores foram separados em grupos de ligação utilizando o comando “group” com “LOD score” (“log-likelihood of odds”) mínimo igual a 4 e frequência de recombinação máxima (θ) igual a 0,3. A seguir, para cada grupo, estabeleceu-se uma sequência “framework” de marcadores suportada por $LOD > 2$ utilizando o comando “order”. Os marcadores que não puderam ser ordenados com essa precisão ($LOD > 2$) foram posicionados com o comando “try”. Aqueles que puderam ser posicionados com $LOD > 1,5$ são apresentados entre parênteses no intervalo correspondente entre marcadores “framework”, que estão em negrito. Marcadores a menos de 5 cM de um marcador “framework” e que poderiam ser posicionados de um lado ou do outro do mesmo com $LOD > 2$ em comparação aos demais intervalos, foram posicionados ao lado desse marcador e diferenciam-se destes por estarem em fonte normal e não em negrito. Os demais marcadores são apresentados no intervalo entre marcadores “framework” que correspondem às suas posições mais prováveis, em fonte normal. As distâncias em centimorgan (cM) foram calculadas utilizando a função de mapeamento de Kosambi.

Os grupos de ligação foram identificados por um número, seguido da letra L, para os pertencentes ao conjunto que representou o genoma de L-3436, ou da letra C, para os pertencentes ao conjunto que representou o genoma de CM334. Os marcadores codominantes foram utilizados para relacionar os grupos de ligação obtidos para os dois conjuntos. Grupos correspondentes definidos em conjuntos distintos receberam o mesmo número. Como nem todos os grupos possuíam marcadores codominantes, efetuou-se adicionalmente uma análise com os dois conjuntos combinados para verificar a relação entre os grupos restantes, utilizando o comando “group”, pois, ao contrário das estimativas de frequência de recombinação e da ordenação dos locos, a separação dos marcadores em grupos raramente é prejudicada pela mistura de marcadores em fases de ligação diferentes (KNAPP et al., 1995). Os grupos que se mostraram ligados por essa análise também receberam o mesmo número.

2.11. Avaliação de doença em famílias F₃

As 114 famílias F₃ obtidas pela autofecundação das plantas da população de mapeamento foram avaliadas quanto à resistência a *P. capsici* em três inoculações distintas. Todas as inoculações foram realizadas em bandejas plásticas com dimensões internas de 39 x 27 x 10 cm, contendo uma mistura de solo, areia e esterco bovino curtido na proporção de 3:1:1. Em cada bandeja foram semeadas quatro linhas de famílias F₃ ou progenitores, com 40 sementes/linha, de acordo com sorteio realizado previamente para a casualização dos experimentos.

Na inoculação 1, cada bandeja recebeu três famílias F₃ e uma linha de CM334 ou L-3436, totalizando 38 bandejas, com 19 linhas de cada um dos progenitores e uma linha de cada família F₃. Nas inoculações 2 e 3, cada família F₃ foi representada por duas repetições e linhas dos progenitores foram casualizadas juntamente com o restante dos tratamentos, em um total de 12 linhas de cada progenitor na inoculação 2 e nove na inoculação 3, totalizando 63 e 62 bandejas, respectivamente. Nas linhas em que a germinação foi desuniforme, eliminaram-se, antes da inoculação, as plantas

que germinaram muito tardiamente. O número médio de plantas por linha foi de 27,9 para a inoculação 1; 26,3 para a inoculação 2 e 18 para a inoculação 3.

As inoculações foram realizadas com suspensões de 5×10^4 zoósporos/mL dos isolados Phc-1 (grupo A2), Phc-2 (grupo A1) e UFV-T (grupo A1) conjuntamente, exceto na inoculação 3, onde foi utilizado apenas o isolado Phc-1. O processo de inoculação consistiu em distribuir 40 mL dessa suspensão uniformemente ao longo da linha de plantio, a cerca de 1 cm das plantas. Na inoculação 1, esse processo foi realizado com um Becker de capacidade de 50 mL, distribuindo-se a suspensão em apenas um dos lados das linhas. Nas outras duas foram utilizadas seringas plásticas de capacidade de 20 mL, aplicando-se esse volume de suspensão de cada um dos lados das linhas. Quando necessário, realizou-se uma irrigação antes da inoculação, para que esta fosse sempre realizada em solo úmido. As inoculações foram realizadas aos 37 (inoculações 1 e 2) ou 40 (inoculação 3) dias após a semeadura. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em telado nos experimentos de inoculação 1 e 3 e em casa-de-vegetação no experimento de inoculação 2. A partir do terceiro dia após a inoculação (d.a.i.), a cada dois ou três dias, foram registradas o número de plantas saudas e o número de plantas com sintomas de murcha e necrose do coleto por linha, até os 15 d.a.i. para a inoculação 1 e até os 11 d.a.i. para as inoculações 2 e 3. Os resultados da última data de avaliação foram convertidos para porcentagens de sobrevivência. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para determinar as correlações entre as três inoculações.

2.12. Análise de QTLs

Todas as regiões genômicas marcadas por um loco RAPD foram testadas inicialmente por análise de regressão simples, implementada pelo programa QGENE (NELSON, 1994, 1997), com a porcentagem de sobrevivência das famílias F_3 como variável dependente e o fenótipo molecular como variável independente, de acordo com o modelo: $y_j = b_0 + b_1x_{1j} + b_2x_{2j} + \varepsilon_j$, onde y_j é o valor da porcentagem de sobrevivência

para a família j , x_{1j} é a variável criada para o efeito aditivo do marcador, x_{2j} é a variável criada para o efeito de dominância do marcador, b_0 é o intercepto da regressão que é estimado pela média geral de sobrevivência das famílias, b_1 é o parâmetro inclinação para o efeito aditivo, b_2 é o parâmetro inclinação para o efeito de dominância e ε_j é o erro associado à família j . A variável x_{1j} assume valores de 0, 1 e 2 para as classes genóticas aa , Aa e AA , respectivamente, para um marcador codominante. Para um marcador dominante, aa e AA recebem os mesmos valores (0 e 2), e as classes genóticas ambíguas a_+ e A_+ são calculadas com base nas frequências esperadas para os dois genótipos que compõem cada classe no tipo de população em questão. Em F_2 , o cálculo do valor de A_+ baseia-se na proporção 1:2 entre AA e Aa . Assim, $A_+ = (2 \times 1/3) + (1 \times 2/3) = 1,33$. Da mesma forma, a_+ recebe o valor de $(0 \times 1/3) + (1 \times 2/3) = 0,67$ (NELSON, 1994). A variável x_{2j} assume valores de 1, -2 e 1 para os genótipos aa , Aa e AA , respectivamente, para um marcador codominante. Para marcadores dominantes, como não são identificados os heterozigotos, não é possível estimar o termo de dominância, que então apresenta sempre valor 0, o que não quer dizer que o efeito do QTL é apenas aditivo, mas sim que não é possível estimar os efeitos separadamente (NELSON, 1994). Um total de 174 testes foram realizadas para cada experimento de inoculação. Foi adotado um nível de significância de $P < 5 \times 10^{-3}$, esperando menos de 0,87 falso-positivos por chance apenas. Na verdade essa estimativa é conservadora, pois assume que os testes são independentes, quando na verdade eles não são, em razão da ligação entre marcadores (NELSON, 1994).

A análise de QTLs foi também realizada utilizando o mapeamento de intervalo baseado em estimativas de máxima verossimilhança e LOD scores implementado pelo programa MAPMAKER/QTL (LANDER e BOTSTEIN, 1989; LINCOLN et al., 1992b). O nível de significância para se declarar a presença de um QTL foi calculado para se obter um erro tipo I total (“genome-wide”) inferior a 5%, que corresponde a um valor mínimo de LOD de 2,11, obtido de acordo com a fórmula $LOD = \frac{1}{2}(\log_{10}e) (Z_{\alpha/M})^2$, onde M é o número de intervalos testados, igual a 55 neste caso, α é a probabilidade de erro tipo I para todo o experimento, $\alpha=0,05$, e Z é o valor tabelado da função de distribuição normal

padrão associado à probabilidade α/M (LANDER e BOTSTEIN, 1989). O valor de LOD correspondente a $\alpha=0,01$ é 2,76. As posições dos QTLs dentro dos intervalos foram obtidas nos pontos em que observaram-se os valores máximos de LOD score.

A técnica de mapeamento de intervalo composto (“Composite Interval Mapping”, CIM (ZENG, 1994)) foi utilizada para verificar a presença de mais de um QTL no grupo de ligação 2C por meio do programa QTL Cartographer (BASTEN et al., 1999), com testes a cada 1 cM e 10 cM de “window size” para controlar a interferência de outros QTLs em um modelo de regressão “forward e backward”. O nível de significância escolhido foi LOD=3,0, para uma probabilidade de erro tipo I de 5% para o experimento todo, com base na distribuição de χ^2 com dois graus de liberdade (g.l.), de acordo com ZENG (1994) ($\alpha/M = 0,05/55 = 0,00091$, que corresponde a um valor de LR=14 pela distribuição de χ^2 com 2 g.l., que dividido por 4,6 resulta em LOD = 3).

3. RESULTADOS

3.1. Resistência de Criollo de Morelos 334, L-3513, L-3436 e California Wonder a *Phytophthora capsici* sob diferentes concentrações de inóculo aplicadas ao solo

As concentrações de 10^2 , 5×10^2 e 10^3 zoósporos/mL foram inadequadas para avaliação de resistência, pois mesmo aos 16 dias após a inoculação registrou-se baixa incidência de doença nos genótipos suscetíveis (L-3513: 5% e 21%; California Wonder: 1,5% e 5%, para 10^2 e 5×10^2 zoósporos/mL, respectivamente; resultados para 10^3 zoósporos/mL encontram-se na Figura 1A). Não se registrou incidência em CM334 nessas concentrações. Mesmo nas concentrações mais altas, poucas plantas de CM334 apresentaram sintomas até os 16 dias após a inoculação (5×10^3 : 4,5%; 10^4 : 9%; 5×10^4 : 11,8%), com uma tendência de aumento da incidência com o aumento da concentração (Figura 1D, E e F).

Para os suscetíveis, obteve-se 100% de incidência aos 4 d.a.i. com 5×10^4 zoósporos/mL, resultado obtido somente aos 11 d.a.i. com 10^4 e somente aos 14 (L-3513) ou 16 d.a.i. (California Wonder) com 5×10^3 zoósporos/mL (Figura 1B, C e D). Não se obteve 100% de mortalidade para L-3436. Ao final do período experimental, os resultados obtidos para essa linhagem com as três maiores concentrações de zoósporos foram semelhantes (5×10^3 : 87,1%; 10^4 : 93,6%; 5×10^4 : 94,4%), mas incidências superiores a

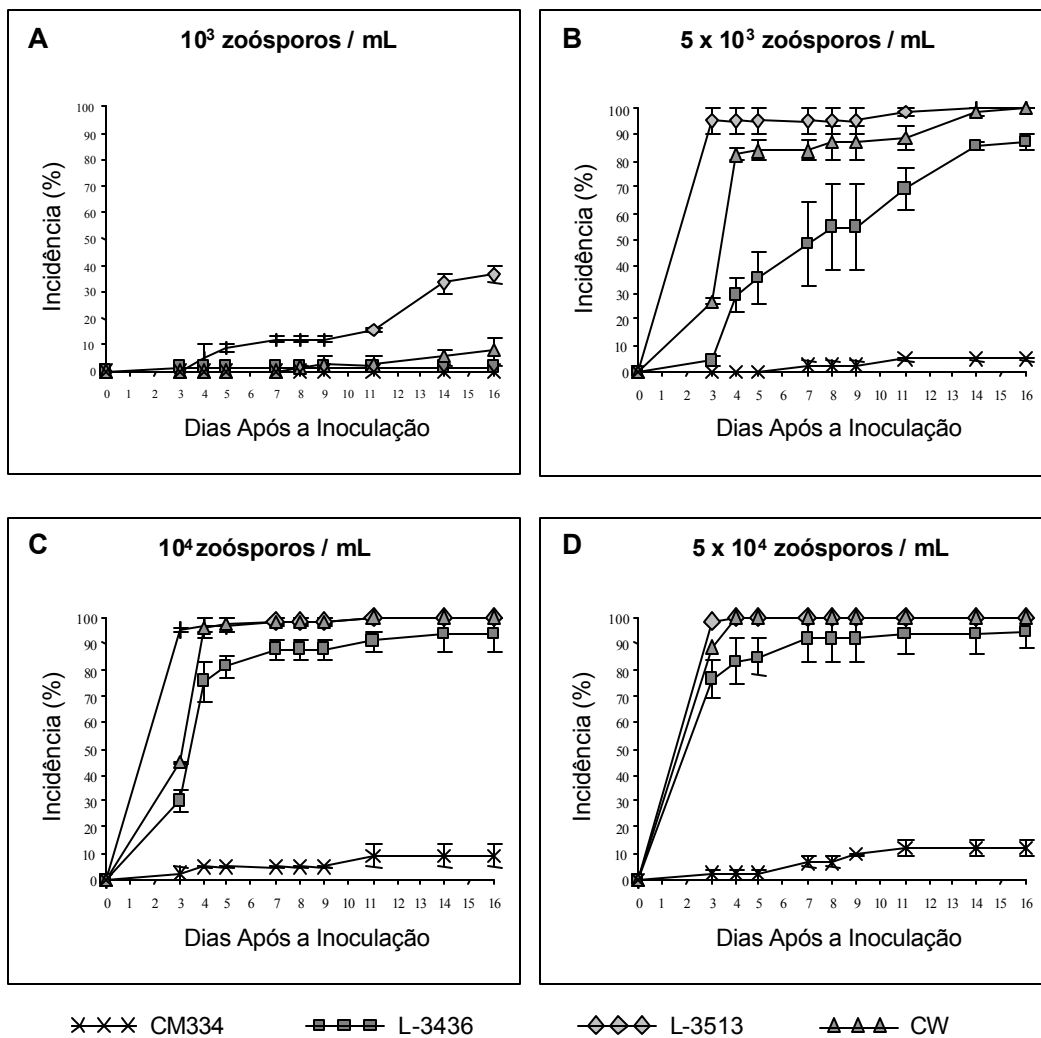


Figura 1 – Efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Phytophthora capsici* sobre a incidência de necrose do colo e murcha em CM334, L-3513, L-3436 e California Wonder. Médias de duas repetições. As barras indicam as amplitudes dos valores registrados.

80% foram obtidas aos 5 e 4 d.a.i. a 10^4 e 5×10^4 zoósporos/mL, respectivamente, enquanto a 5×10^3 isso só ocorreu aos 14 d.a.i. (Figura 1B, C e D).

Os resultados apontam a linhagem L-3513 como a mais suscetível dentre as variedades testadas. Na concentração de 10^3 zoósporos/mL, essa linhagem foi a única a apresentar incidência de doença relevante (36,7% aos 16 dias - Figura 1A). A 5×10^3 zoósporos/mL, embora California Wonder e L-3513 apresentassem 100% de incidência aos 14 d.a.i., notou-se um atraso no progresso da doença na primeira em relação à última, com grande diferença aos 3 d.a.i. e uma pequena diferença que se manteve dos 4 aos 11 dias (Figura 1B). Essa concentração evidenciou também o nível de resistência intermediário da linhagem L-3436 em relação às demais variedades, cujo efeito diminuiu com o aumento do período de exposição ao inóculo (Figura 1B). A 10^4 zoósporos/mL, a diferença entre L-3513 e California Wonder só foi observada aos 3 d.a.i. (Figura 1C). A 5×10^4 , praticamente não houve diferença (Figura 1D). Nessas duas concentrações, L-3436 apresentou consistentemente menores valores de incidência ao longo de todo o período experimental, mas a diferença entre este e L-3513 e California Wonder foi pequena.

3.2. Avaliação de resistência a *P. capsici* por atomização da parte aérea

Em teste preliminar com duas concentrações de inóculo (10^3 e 10^4 zoósporos/mL) atomizadas em oito plantas de L-3513, L-3436 e CM334 aos 30 dias após a semeadura, registrou-se apenas 50% de incidência em plantas de L-3513 inoculadas com 10^3 zoósporos/mL e apenas 12,5% em L-3436 até os 21 d.a.i.. Já a 10^4 zoósporos/mL, 100% das plantas de L-3513 morreram até os 4 d.a.i. e 100% das plantas de L-3436 morreram até os 6 d.a.i. Da mesma forma que o observado para inoculações via solo, a concentração de 10^3 zoósporos/mL foi insuficiente para propiciar 100% de incidência na linhagem suscetível L-3513 em inoculações por atomização.

Confirmou-se a resistência de CM334 à inoculação na parte aérea, pois, mesmo a 10^4 zoósporos/mL, as oito plantas inoculadas foram resistentes. Em três dessas plantas, observou-se infecção e necrose da gema apical e de uma ou duas das folhas mais jovens adjacentes a ela. A infecção, entretanto, ficou confinada a essa região, não progredindo para o caule como se observou em L-3513 e L3436, nos quais lesões que se iniciaram em folhas se

expandiram rapidamente até alcançar o pecíolo e por fim o caule, necrosando-o em toda a sua circunferência e matando a planta. Nas três plantas de CM334 com sintomas, aos 21 d.a.i., a única consequência da infecção foi a emissão de brotações em função da perda de dominância apical. Nenhum outro sintoma foi observado no caule ou folhas de CM334. Já em L-3513 e L-3436, lesões iniciadas no próprio caule, em folhas ou no ápice das plantas progrediram até matar as mesmas.

Realizaram-se outros dois experimentos para a avaliação da resistência da parte aérea de CM334, L-3436, L-3513 e California Wonder à inoculação de *P. capsici* por atomização. Os resultados desses experimentos confirmaram a alta suscetibilidade da linhagem L-3513, que apresentou 100% de mortalidade na primeira avaliação aos 4 ou 5 d.a.i., e a resistência de CM334 (Figura 2). Registraram-se sintomas em CM334 apenas no experimento 1, no qual duas das 47 plantas inoculadas apresentaram infecção restrita à gema apical e folhas adjacentes, conforme descrito anteriormente. A linhagem L-3436 e o cultivar California Wonder apresentaram níveis de suscetibilidade intermediários entre esses dois extremos. As médias das notas observadas em L-3436 foram consistentemente inferiores às observadas em California Wonder nos dois experimentos (Figura 2). Ao final dos dois experimentos (17 ou 15 d.a.i.), as médias das notas de California Wonder superaram 4 (4,2 e 4,3), enquanto L-3436 apresentou média 3,0 no experimento 1 e 3,6 no experimento 2.

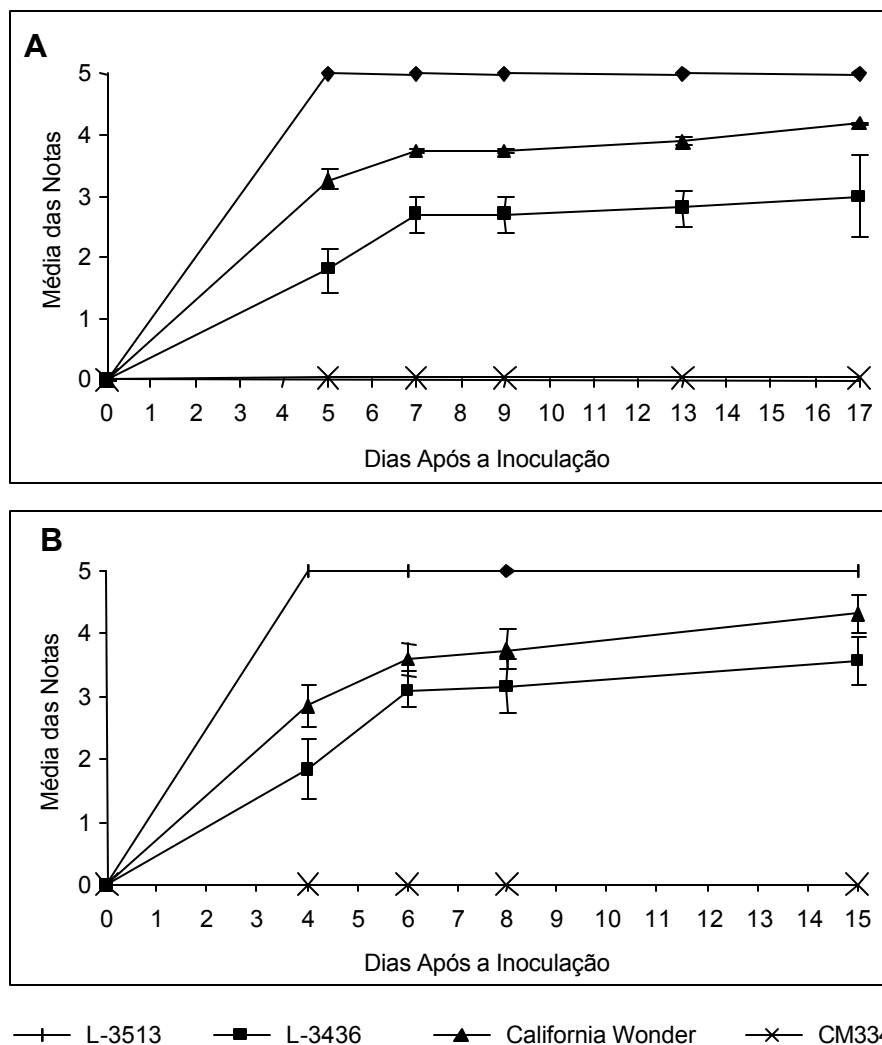


Figura 2 – Médias das notas observadas para as diferentes variedades (0 = sem sintomas; 5 = plantas mortas) após a atomização de uma suspensão com 10^4 zoósporos de *Phytophthora capsici*/mL em plantas aos 40 (A) ou 53 (B) dias após a semeadura. A = Experimento 1; B = Experimento 2. Médias de duas repetições. As barras indicam as amplitudes dos valores registrados.

3.3. Avaliação da resistência em progênes de cruzamentos de CM334 com as linhagens L-3513 e L-3436 e com o cultivar California Wonder

3.3.1. Avaliação dos híbridos F₁

Foram realizadas inicialmente dois ensaios com 10^4 zoósporos/mL, utilizando apenas o isolado UFV-T. Na primeira, avaliaram-se apenas CM334, California Wonder e a respectiva F1. Na Segunda, além desses, incluíram-se L-3436 e os híbridos F1 CM334 x L-3436 e L-3436 x L-3513. Os resultados encontram-se sumarizados no Quadro 3. Como não se observaram diferenças entre os cruzamentos recíprocos que sugerissem a presença de efeitos citoplasmáticos neste e em outros experimentos apresentados adiante, bem como em trabalhos realizados por outros autores (GIL ORTEGA et al., 1992; REIFSCHNEIDER et al., 1992; WALKER e BOSLAND, 1999), os resultados foram combinados para facilitar a visualização e interpretação.

Os resultados observados para os parentais estão de acordo com o observado no experimento de concentração de inóculo, com baixa incidência em CM334 (0 e 14,3%), 100% em California Wonder e mais de 80% em L-3436 (81,8%). O híbrido entre L-3436 e L-3513 foi altamente suscetível, como previamente relatado por LEITE (1999). Quando inoculado aos 30 dias após a semeadura, o híbrido entre California Wonder e CM334 apresentou alta incidência de necrose do coleto e murcha (100 e 82,3%), sugerindo que, nesse estágio, os genes de resistência de CM334 não foram efetivos quando em heterozigose nesse "background". Já no híbrido de CM334 com L-3436, a incidência de doença foi baixa, sugerindo uma contribuição efetiva de L-3436 para a resistência (Quadro 3).

Os resultados das duas inoculações realizadas com a mistura de isolados, a 5×10^4 zoósporos/mL, nos híbridos F1, encontram-se no Quadro 4. Nas duas inoculações, obtiveram-se 100% de incidência nos genótipos suscetíveis California Wonder, L-3513 e o híbrido L-3436 x L-3513, este último presente apenas na inoculação 1, e baixa incidência em CM334 (15,8 e 2,7%) (Quadro 4). Observou-se maior incidência de doença em CM334, L-3436 e nos híbridos de CM334 com L-3436 e California Wonder na inoculação 1, quando

Quadro 3 – Resultados de inoculações via solo de *Phytophthora capsici* isolado UFV-T a 10^4 zoósporos/mL em parentais e híbridos F1 de *Capsicum annuum* aos 30 dias após a semeadura

Inoculação 1¹

Geração	Número de plantas inoculadas	Número de plantas doentes	Incidência (%)
Parental (CM334)	14	2	14,3
Parental (CW)	16	16	100
F1 (CM334 X CW)	11	11	100
Inoculação 2 ²			
Parental (CM334)	10	0	0
Parental (CW)	62	62	100
Parental (L-3436)	11	9	81,8
F1 (CM334 X CW e recíproco)	34	28	82,3
F1 (CM334 x L-3436)	17	4	23,5
F1 (L-3436 x L-3513)	39	39	100

¹Resultados de avaliação aos 10 dias após a inoculação.

²Resultados de avaliação aos 20 dias após a inoculação.

comparada à observada na inoculação 2, possivelmente por se inocularem plantas mais velhas nesta última. A idade das plantas também pode ser responsável pela menor incidência de doença no híbrido entre CM334 e California Wonder em relação aos resultados apresentados no Quadro 3. A melhor performance dos híbridos de CM334 com L-3436 em relação aos híbridos com California Wonder e L-3513 foi confirmada neste experimento. O híbrido CM334 x L-3513 apresentou alta incidência de doença (94,7 e 95,8% nas inoculações 1 e 2, respectivamente) mesmo em plantas inoculadas aos 55 dias após a semeadura. O híbrido CM334 x California Wonder apresentou valores de incidência superiores aos observados para o híbrido

Quadro 4 – Resultados de inoculações via solo com uma mistura de três isolados de *Phytophthora capsici* a 5×10^4 zoósporos/mL nos parentais (CM334, L-3436, L-3513, California Wonder) e respectivos híbridos F1

Inoculação 1¹

Geração	Número de plantas inoculadas	Número de plantas doentes ²	Incidência (%)
Parental (CM334)	57	9	15,8
Parental (L-3436)	101	93	92,1
Parental (CW)	57	57	100
Parental (L-3513)	90	90	100
F1 (L-3436 x CM334 e recíproco)	106	33	31,1
F1 (CW X CM334 e recíproco)	96	45	46,9
F1 (L-3513 x CM334 e recíproco)	57	54	94,7
F1 (L-3436 x L-3513)	23	23	100
Inoculação 2 ³			
Parental (CM334)	149	4	2,7
Parental (L-3436)	56	37	66,6
Parental (CW)	62	62	100
Parental (L-3513)	37	37	100
F1 (L-3436 x CM334 e recíproco)	89	6	6,7
F1 (CW X CM334 e recíproco)	108	36	33,3
F1 (L-3513 x CM334 e recíproco)	48	46	95,8

¹Inoculação efetuada aos 46 dias após a sementeira.

²Avaliação final aos 15 dias após a inoculação.

³Inoculação efetuada aos 55 dias após a sementeira.

CM334 x L-3436 (46,9 vs. 31,1 e 33,3 vs. 6,7%, nas inoculações 1 e 2, respectivamente), porém muito inferiores aos observados para o híbrido CM334 x L-3513 (Quadro 4). A ordem de suscetibilidade dos híbridos coincide com a ordem de suscetibilidade dos parentais, estabelecida em experimentos anteriores com inoculação via solo ou por atomização da parte aérea,

sugerindo que o nível de resistência do parental recorrente, e não apenas o da fonte de resistência, é de grande importância para a obtenção de genótipos resistentes a *P. capsici*.

3.3.2. Avaliação das gerações F₂ e dos retrocruzamentos

Para verificar se as diferenças registradas em F₁ seriam também observadas nos retrocruzamentos e F₂, assim como para comparar as proporções entre indivíduos resistentes e suscetíveis com modelos de herança propostos em estudos anteriores (GUERRERO MORENO e LABORDE, 1980; GIL ORTEGA et al., 1991; REIFCHNEIDER et al., 1992; WALKER e BOSLAND, 1999), inocularam-se as F₂ e retrocruzamentos obtidos do cruzamento de CM334 com L-3436, L-3513 e California Wonder. Na inoculação 1, plantas aos 45 dias após a semeadura foram inoculadas com uma suspensão a 5×10^4 zoósporos/mL da mistura dos três isolados de *P. capsici*. Na inoculação 2, plantas aos 36 dias após a semeadura foram inoculadas com uma suspensão a 10^4 zoósporos/mL do isolado Phc-1 apenas.

Observou-se 100% de incidência em L-3513 e California Wonder nas duas inoculações. A incidência em L-3436 está de acordo com o observado em experimentos anteriores (88,2 e 89,3%). A maior incidência em CM334 na inoculação 2 (23,1 vs. 0) bem como nos retrocruzamentos e F₂ sugere que esta inoculação foi mais severa que a inoculação 1, possivelmente porque nesta última inocularam-se plantas mais velhas (Quadro 5).

Assim como o observado em F₁, os cruzamentos de CM334 com variedades mais suscetíveis apresentaram maiores valores de incidência de doença. As gerações F₁, F₂ e retrocruzamentos do cruzamento com L-3436 apresentaram menores valores de incidência de doença, confirmando a

Quadro 5 – Resultados de inoculações com *Phytophthora capsici* em plantas das gerações parentais, F₁, F₂ e retrocruzamentos resultantes de cruzamentos entre CM334 e L-3436, L-3513 ou California Wonder (CW)

Inoculação 1¹

Geração	Número de plantas inoculadas	Número de plantas doentes	R : S*	Incidência (%)
Parental (CM334)	119	0		0
Parental (L-3436)	102	90		88,2
Parental (CW)	107	107		100
Parental (L-3513)	90	90		100
Cruzamentos com L-3436:				
Retrocruzamento (F1 x CM334)	191	18	173 : 18	9,4
Retrocruzamento (F1 x L-3436)	180	113	67 : 113	62,8
F2 (L-3436 x CM334)	154	48	106 : 48	31,2
Cruzamentos com California Wonder:				
Retrocruzamento (F1 x CM334)	187	41	146 : 41	21,9
Retrocruzamento com CW (F1 x CW)	55	53	2 : 53	96,4
F2 (CW x CM334)	181	117	64 : 117	64,6
Cruzamentos com L-3513:				
Retrocruzamento (F1 x CM334)	175	50	125 : 50	28,6
Retrocruzamento (F1 x L-3513)	103	103	0 : 103	100
F2 (L-3513 x CM334)	209	171	38 : 171	81,8
Inoculação 2 ²				
Geração	Número de plantas inoculadas	Número de plantas doentes	R : S	Incidência (%)
Parental (CM334)	333	77		23,1
Parental (L-3436)	178	159		89,3
Parental (CW)	223	223		100
Parental (L-3513)	178	178		100
Cruzamentos com L-3436:				
F1 (L-3436 x CM334)	116	87		75
Retrocruzamento (F1 x CM334 e recíproco)	112	75	37 : 75	67
Retrocruzamento (F1 x L-3436)	91	69	22 : 69	75,8
F2 (L-3436 x CM334)	132	89	43 : 89	67,4
Cruzamentos com California Wonder:				
F1 (CW x CM334)	75	64		85,3

Quadro 5, Cont.

Geração	Número de plantas inoculadas	Número de plantas doentes	R : S	Incidência (%)
Retrocruzamento (F1 x CM334)	130	85	45 : 85	65,4

Retrocruzamento (CW x F1)	83	77	6 : 83	92,8
F2 (CW x CM334)	110	99	11 : 99	90
Cruzamentos com L-3513:				
F1 (CM334 x L-3513)	43	41		95,4
Retrocruzamento (F1 x CM334)	131	86	45:86	65,6
Retrocruzamento (F1 x L-3513)	133	133	0 : 133	100
F2 (L-3513 x CM334)	135	128	7 : 128	94,8

*Número de plantas resistentes : número de plantas suscetíveis

¹Plantas inoculadas aos 45 dias após a semeadura com uma suspensão a 5×10^4 zoósporos/mL da mistura dos três isolados de *P. capsici*. Avaliação final aos 14 dias após a inoculação.

²Plantas inoculadas aos 36 dias após a semeadura com uma suspensão a 10^4 zoósporos/mL do isolado Phc-1. Avaliação final aos oito dias após a inoculação.

importante contribuição deste parental para a expressão da resistência. Manteve-se a ordem de suscetibilidade verificada anteriormente, mas desta feita as progênies de cruzamentos de CM334 com California Wonder não diferiram tanto daquelas do cruzamento com L-3513. Ambas apresentaram incidências bem superiores às observadas no cruzamento com L-3436, sobretudo na inoculação 1, em que foram inoculadas plantas mais velhas. Na inoculação 2, as incidências mais altas, possivelmente em função da menor idade das plantas, reduziram as diferenças devido ao suscetível utilizado no cruzamento (Quadro 5). Em outra inoculação realizada em bandejas com plantas de mesma idade das da inoculação 2, somente para as gerações derivadas do cruzamento entre CM334 e L-3436, foram observados valores de incidência de doença semelhantes aos observados na inoculação 2, confirmando a alta severidade de inoculações nessas condições (Quadro 6).

Quadro 6 – Resultados de inoculações com *Phytophthora capsici* em plantas das gerações parentais, F₁, F₂ e retrocruzamentos resultantes de cruzamentos entre CM334 e L-3436. As plantas foram inoculadas aos 36 dias após a semeadura com uma suspensão a 5×10^4 zoósporos/mL de uma mistura de três isolados de *P. capsicie* avaliadas até os 14 dias após a inoculação

Geração	Número de plantas inoculadas	Número de plantas doentes	R : S*	Incidência (%)
Parental (CM334)	196	74		37,8
Parental (L-3436)	290	287		99,0
F1 (L-3436 x CM334 e recíproco)	175	98		56,0
Retrocruzamento (F1 x CM334)	301	106	195 : 106	35,2
Retrocruzamento (L-3436 x F ₁)	240	179	61 : 179	74,6
F2 (L-3436 x CM334)	306	219	87 : 219	71,6

*Número de plantas resistentes : número de plantas suscetíveis.

Os resultados obtidos nos experimentos de inoculação em bandejas não puderam ser explicados por nenhum dos modelos de herança sugeridos para a resistência a *P. capsici* em CM334. Estes incluem modelos com dois genes recessivos (GUERRERO-MORENO e LABORDE, 1980), três genes, sendo necessária a condição heterozigótica nos três locos ou pelo menos quatro alelos em qualquer arranjo para expressar a resistência (GIL-ORTEGA et al., 1991), dois genes com epistasia dominante e recessiva (REIFSCHNEIDER et al., 1992), um gene dominante ou dois genes dominantes complementares (WALKER e BOSLAND, 1999). Os modelos propostos por SARAIVA (1982), com dois pares de genes recessivos complementares e um modificador dominante, considerando as hipóteses em que os genes estejam em homozigose nos progenitores, também não explicaram os resultados para nenhum dos cruzamentos.

Sob condições de inoculação mais brandas (plantas mais velhas, em recipientes individuais, inoculação com suspensão a 10^4 zoósporos/mL), populações F₁, F₂, e retrocruzamentos derivadas do cruzamento entre L-3436 e CM334, bem como L-3436, os valores de incidência de doença foram mais baixos que os apresentados anteriormente (Quadro 7). Os resultados obtidos aproximam-se dos esperados para a hipótese de dois genes dominantes independentes, cada um conferindo resistência em um dos parentais,

considerando que o excesso de suscetíveis observado seja em razão da mortalidade que ocorre mesmo na presença desses genes, como sugerem as incidências registradas nos parentais. Assim, pode-se esperar mortalidade de 16% das plantas com alelo favorável apenas no loco que confere resistência herdado de L-3436, e 4,2% daquelas com o alelo favorável apenas no loco herdado de CM334. As plantas que possuem pelo menos um dos alelos favoráveis em cada um dos dois locos devem apresentar 0% de incidência, como sugere o comportamento das plantas F₁. Calcularam-se os valores esperados corrigidos, considerando-se a incidência nos parentais, e os valores de Qui-quadrado, para testar a adequação dos valores observados a essa hipótese (Quadro 8). A hipótese de dois genes, cada um herdado de um dos parentais, mostrou-se adequada para explicar os resultados observados (P<0,05).

3.4. Polimorfismo genético entre o acesso resistente não-domesticado Criollo de Morelos CM334, a linhagem L-3436 e o cultivar California Wonder

As reações RAPD apresentaram uma amplificação média de 7 bandas/reação. Dos 917 “primers” avaliados, 510 revelaram polimorfismo entre o acesso resistente Criollo de Morelos e o progenitor suscetível L-3436 (55,6%), totalizando 720 bandas polimórficas (1,4 bandas/primer); 506 revelaram polimorfismo entre Criollo de Morelos e o outro progenitor suscetível, California Wonder (55,2%), gerando 696 bandas polimórficas (1,4 bandas/primer). Entre os dois genótipos domesticados, apenas 9,2% dos primers revelaram polimorfismos (139 bandas polimórficas, 1,7 bandas/primer) (Figura 3).

Quadro 7 – Resultados de inoculação de CM334, de L-3436 e das gerações F₁, F₂ e retrocruzamentos, efetuada mediante a aplicação ao solo de 3 mL por planta de uma suspensão a 10⁴ zoósporos/mL do isolado Phc-1 de *Phytophthora capsici*, em plantas mantidas individualmente em copos plásticos de 500 mL. As plantas foram inoculadas duas vezes, uma aos 44 dias após a semeadura e outra aos 57 dias após a semeadura. O cultivar California Wonder foi

incluído como testemunha suscetível. A avaliação foi realizada aos 30 dias após a primeira inoculação

Geração	Número de plantas inoculadas	Número de plantas doentes	R : S	Incidência (%)
Parental (CM334)	24	1		4,2
Parental (L-3436)	25	4		16,0
Suscetível (CW)	11	11		100,0
F ₁ (L-3436xCM334)	50	0		0,0
F ₂ (L-3436xCM334)	203	23	180 : 23	11,3
Retrocruzamento com L-3436 (F ₁ xL-3436)	95	12	83 : 12	12,6
Retrocruzamento com CM334 (CM334xF ₁)	102	4	98 : 4	3,9

3.5. Análise de ligação

Selecionaram-se os 150 “primers” que produziram polimorfismos nítidos na triagem para avaliação na população de mapeamento, constituída por 114 indivíduos F₂ do cruzamento entre L-3436 e CM334. Dentre estes “primers”, entretanto, 47 não produziram resultados aproveitáveis por um dos seguintes motivos: a) O polimorfismo detectado na triagem não foi confirmado em ampliações posteriores (6 “primers”); b) Não foram obtidas ampliações com a qualidade necessária para a avaliação (7 “primers”); c) A banda polimórfica não segregou na população F₂ (7 “primers”); d) O polimorfismo, embora evidente entre os parentais, não pôde ser avaliado de forma confiável na população de mapeamento (21 “primers”); e) Falta de reprodutibilidade do marcador polimórfico em ampliações distintas (6 “primers”).

Quadro 8 – Teste de adequação dos valores observados à hipótese de dois genes dominantes independentes, cada um originário de um dos parentais (L-3436 e CM334), como responsáveis pela resistência a *Phytophthora capsici*

Geração	Genótipo	Esperado : S	Esperado corrigido** R · S	Observado R · S	χ^2	P
---------	----------	--------------	-------------------------------	--------------------	----------	---

			R : S	R : S		
F ₂	9 L_ C_*	114 : 0	114 : 0			
	3 L_ cc	38 : 0	32 : 6 ¹			
	3 II C_	38 : 0	36 : 2 ²			
	1 II cc	0 : 13	0 : 13			
	Total	190 : 13	182 : 21	180 : 23	0,21	0,65
F ₁ xL-3436	1 L_ Cc	47,5 : 0	47,5 : 0			
	1 L_ cc	47,5 : 0	39,9 : 7,6 ³			
	Total	95 : 0	87,4 : 7,6	83 : 12	2,77	0,10
CM334 x F ₁	1 LI C_	51 : 0	51 : 0			
	1 II C_	51 : 0	48,9 : 2,1 ⁴			
	Total	102 : 0	99,9 : 2,1	98 : 4	1,57	0,21

*L – loco que confere resistência em L-3436; C – Loco que confere resistência em CM334.

**Valores esperados corrigidos de acordo com a incidência de doença observada nos parentais.

¹38 x 0,16 = 6; ²38 x 0,042 = 2; ³47,5 x 0,16 = 7,6; ⁴51 x 0,042 = 2,1.

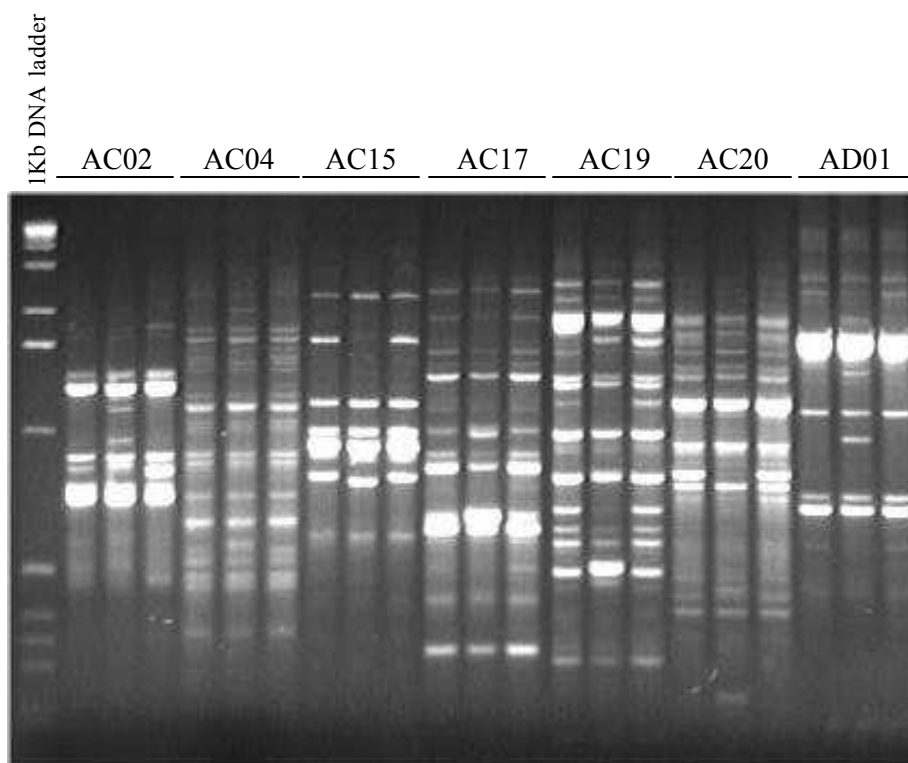


Figura 3 – Amplificações RAPD do DNA de L-3436, CM334 e California Wonder, nessa ordem, com sete “primers” das séries AC e AD. Polimorfismos entre CM334 e os dois genótipos domesticados, L-3436 e California Wonder, são visíveis para os “primers” AC02, AC15, AC19, AC20 e AD01. Polimorfismos entre L-3436 e California Wonder são raros, sendo observado neste gel apenas um para o “primer” AC19.

Os 103 “primers” restantes amplificaram 174 marcadores polimórficos, perfazendo uma média de 1,7 marcadores/“primer” (Figura 4). Apenas dois destes marcadores, E06_520 ($p=0,023$) e M18_1000 ($p=0,035$), apresentaram desvios significativos da proporção esperada 3:1 de acordo com o teste qui-quadrado (χ^2), tendo sido excluídos da análise de ligação. Foram identificados oito marcadores codominantes (4,6%) que segregaram de acordo com a proporção 1:2:1 (Quadro 9). Um marcador codominante caracteriza-se por:

- i) ser amplificado pelo mesmo “primer” nos dois pais, originando fragmentos de tamanhos ligeiramente diferentes;
- ii) pela ausência de indivíduos

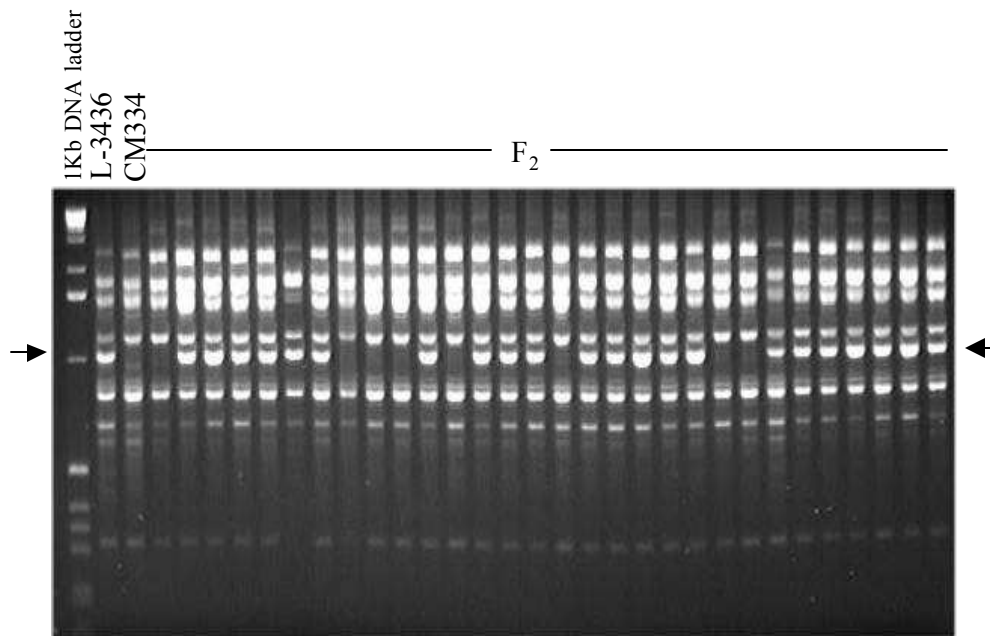


Figura 4 – Segregação de um marcador RAPD dominante (AI01_1000, indicado pela seta) em 30 plantas F₂ da população de mapeamento.

recombinantes sem os dois fragmentos na população de mapeamento e iii) pela ocorrência na população de mapeamento de indivíduos com apenas o fragmento de L-3436 (homozigotos para o alelo de L-3436), indivíduos apresentando os dois fragmentos (heterozigotos) e indivíduos com apenas o fragmento de CM334 (homozigotos para o alelo de CM334) na proporção 1 : 2 : 1 (Figura 5).

O mapa representando o genoma de CM334 foi construído a partir de 77 marcadores, que se distribuíram em 12 grupos de ligação. Estabeleceu-se um “framework” com 42 locos, incluindo 49 marcadores, cobrindo 351,2 cM. Sete marcadores permaneceram não ligados. Cinco grupos de ligação (1C, 2C, 6C, 7C, 8C) apresentaram pelo menos cinco locos “framework”, cobrindo mais de 30 cM cada, com um máximo de 76,6 cM (1C). Os demais ou apresentaram apenas dois marcadores “framework” (4C, 5C, 9C, 10C, 11C, 12C) ou cobriram menos de 10 cM (3C) (Figura 6). A distância média entre os locos “framework”,

Quadro 9 – Segregação de marcadores RAPD codominantes na população de mapeamento

Marcador	Genótipo	Número de plantas F2		χ^2	p
		Observado	Esperado		
AK02cod	Hom. L-3436	27	28,5	0,16	0,928
	Heterozigotos	59	57		
	Hom. CM334	28	28,5		
D13cod	Hom. L-3436	33	28,5	1,16	0,563
	Heterozigotos	52	57		
	Hom. CM334	29	28,5		
E18cod	Hom. L-3436	28	28,5	0,018	0,995
	Heterozigotos	57	57		
	Hom. CM334	29	28,5		
F07cod	Hom. L-3436	31	28,25	4,03	0,133
	Heterozigotos	63	56,5		
	Hom. CM334	19	28,25		
L02cod	Hom. L-3436	31	28,5	0,32	0,856
	Heterozigotos	56	57		
	Hom. CM334	27	28,5		
S02cod	Hom. L-3436	29	28,5	0,018	0,995
	Heterozigotos	57	57		
	Hom. CM334	28	28,5		
V14cod	Hom. L-3436	20	28,5	5,48	0,064
	Heterozigotos	69	57		
	Hom. CM334	25	28,5		
Y02cod	Hom. L-3436	33	28,5	2,26	0,323
	Heterozigotos	49	57		
	Hom. CM334	32	28,5		

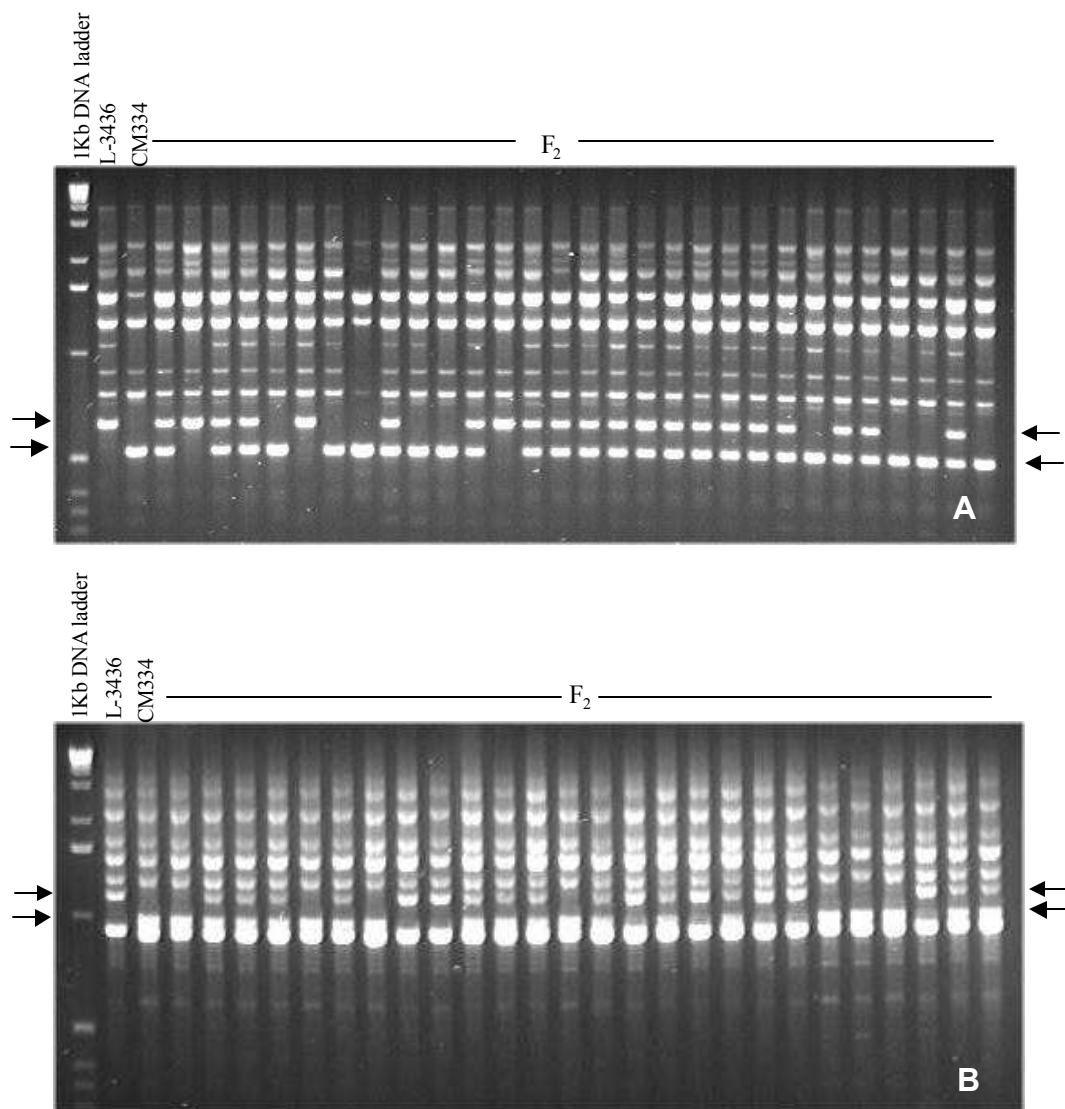


Figura 5 – Segregação de marcadores RAPD codominantes. A – Segregação de V14cod em 30 plantas F₂ da população de mapeamento. B – Segregação de S02cod em 26 plantas F₂ da população de mapeamento. As posições das bandas de cada marcador estão indicadas pelas setas.

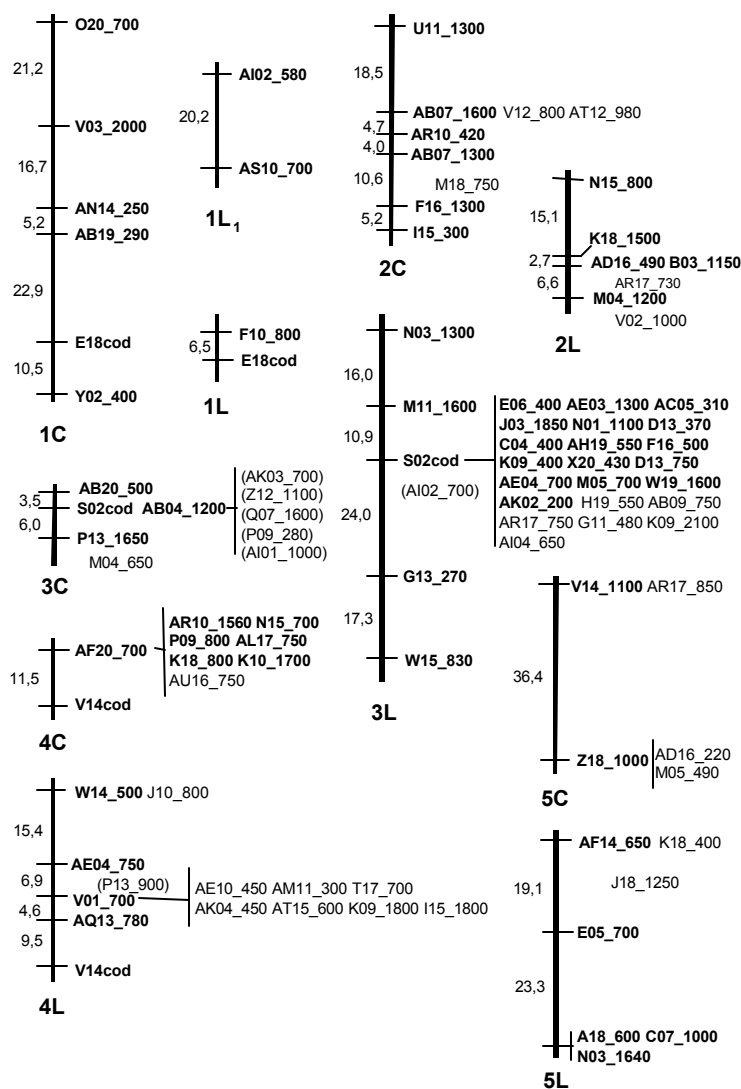


Figura 6 – Mapa de ligação de *Capsicum annum* construído no programa MAPMAKER/EXP 3.0 a partir de marcadores RAPD segregantes em uma população F₂ do cruzamento entre a linhagem L-3436 e “Criollo de Morelos CM334”. A letra C indica que o grupo foi formado com marcadores não amplificados em CM334, ou seja, homozigotos recessivos nesse progenitor. A letra L indica o mesmo para L-3436. Grupos de ligação identificados com o mesmo número são homólogos. Marcadores em negrito foram ordenados com LOD>2 (“framework”). Marcadores em fonte normal associados a um loco “framework” estão a menos de 5 cM desse loco, de um lado ou do outro, com LOD>2 em relação às demais posições. Marcadores em fonte normal e entre parênteses foram posicionados com LOD>1,5. Os demais não puderam ser posicionados com precisão e são apresentados em fonte normal no intervalo que corresponde à localização mais provável. As distâncias em cM apresentadas à esquerda de cada intervalo foram calculadas utilizando-se a função de mapeamento de Kosambi.

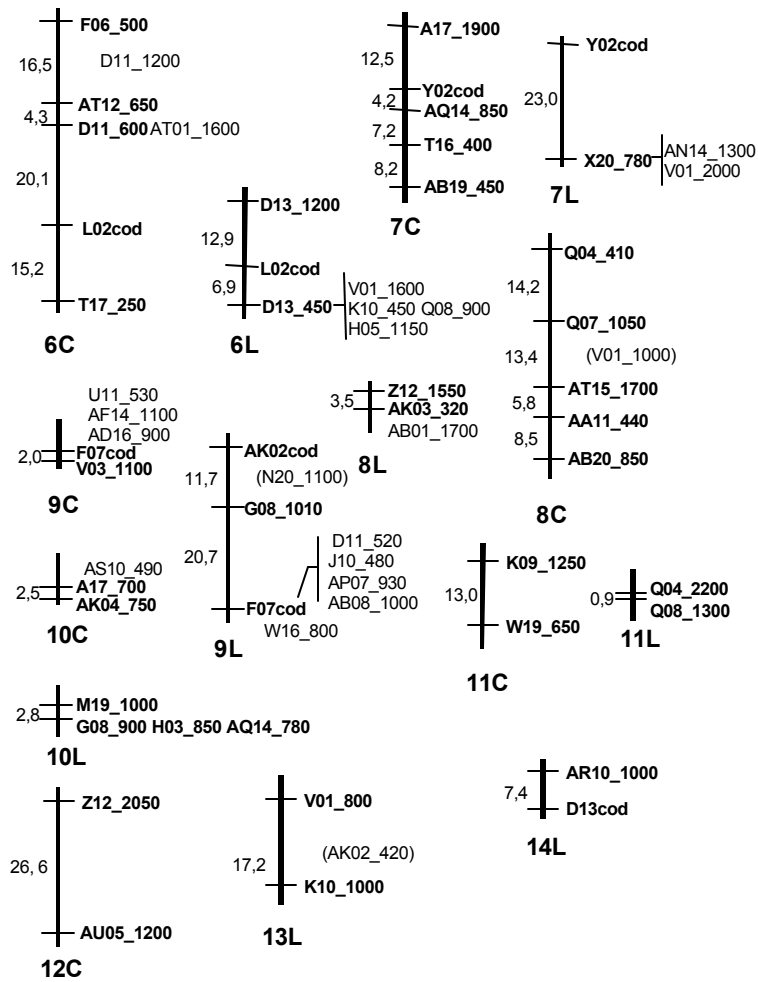


Figura 6, Cont.

desconsiderando as distâncias entre marcadores que co-segregaram, foi 11,7 cM, e a maior distância entre dois locos foi 36,6 cM (grupo 5C).

O mapa representando o genoma de L-3436 foi construído com 103 marcadores, distribuídos em 14 grupos de ligação, contendo 39 locos “framework” e 60 marcadores, cobrindo 305,7 cM. Nove marcadores permaneceram não-ligados. Quatro grupos de ligação (3L, 4L, 5L, 9L) apresentaram três ou mais locos “framework” e cobriram mais de 30 cM, com o maior grupo cobrindo 68,8 cM (3L). Outros dois grupos (2L, 6L) apresentaram três ou mais locos “framework” e cobriram entre 20 e 30 cM. Os outros oito grupos foram formados com apenas dois locos “framework”. A distância média entre os locos “framework”, desconsiderando as distâncias entre marcadores que co-segregaram, foi 12,2 cM, e a maior distância entre dois locos foi 24 cM (grupo 3L).

Os grupos de ligação 1C e 1L, 3C e 3L, 4C e 4L, 6C e 6L, 7C e 7L e 9C e 9L foram identificados como homólogos com base na presença de marcadores codominantes. A correspondência entre os demais foi estabelecida com base nos grupos formados em análise realizada com os dois conjuntos de dados combinados. Permaneceram sem homólogos apenas os grupos 12C, 13L e 14L. Considerando apenas o maior homólogo de cada grupo, a cobertura propiciada pelos mapas seria de pelo menos 496,6 cM, podendo ser maior, pois grupos de ligação homólogos não estão necessariamente cobrindo as mesmas regiões de um cromossomo.

Alguns “clusters” de marcadores foram observados, o maior deles no grupo de ligação 3L, que, por conter o marcador codominante S02cod, pôde ser associado ao “cluster” observado em 3C, totalizando assim 29 marcadores. Os grupos 4C e 4L apresentaram “clusters” com 8 marcadores cada, mas não há como concluir se ambos correspondem à mesma região. “Clusters” menores, com cinco marcadores cada, foram detectados nos grupos 6L e 9L.

3.6. Avaliação de doença nas famílias F₃ derivadas das plantas F₂ da população de mapeamento

As porcentagens de sobrevivência das famílias F₃ apresentaram distribuições aproximadamente contínuas nas três inoculações (Figura 7). Não houve evidência estatística para rejeitar a hipótese nula H₀ de normalidade para os dados das três inoculações, de acordo com a estatística S ($p < 0,05$), calculada pelo programa QTL Cartographer 1.13 (BASTEN et al., 1999) ($S=5,89$, $5,70$ e $4,56$ para inoculações 1, 2 e 3, respectivamente; $S(5\%) = 5,99$). A presença de picos que sugerem uma tendência bimodal pode ser uma indicação da presença de locos de efeito pronunciado. A inoculação 2 foi mais severa que as demais, como evidenciado pelas menores médias para as famílias e para os progenitores (Figura 7). As correlações entre os resultados das três avaliações foram significativas ($P < 10^{-3}$), com valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) variando de $0,61$ a $0,64$ (inoculação 1 vs. inoculações 2 e 3, $r=0,63$ e $0,64$, respectivamente; inoculação 2 vs. inoculação 3, $r=0,61$).

Foram identificadas famílias transgressivas com médias de sobrevivência superiores às observadas em CM334 (Quadro 10). Três famílias apresentaram esse comportamento nas três inoculações. Seis famílias mostraram-se superiores a CM334 em duas inoculações e próximas a este na outra. Outras 12 famílias superaram CM334 em uma das inoculações e apresentaram altas médias de porcentagem de sobrevivência nas outras duas, sendo também listadas no Quadro 10.

3.7. Análise de QTLs

A análise de regressão simples revelou vários marcadores associados com a resistência a *P. capsici* distribuídos nos grupos de ligação 2C, 3C, 5C, 10C, 11C, 12C, 2L, 3L, 4L e 11L, além de um marcador não-ligado (F15_900). Marcadores significativos nos grupos 2C e 11L foram detectados nos três experimentos. Os grupos 10C, 11C e 4L apresentaram marcadores

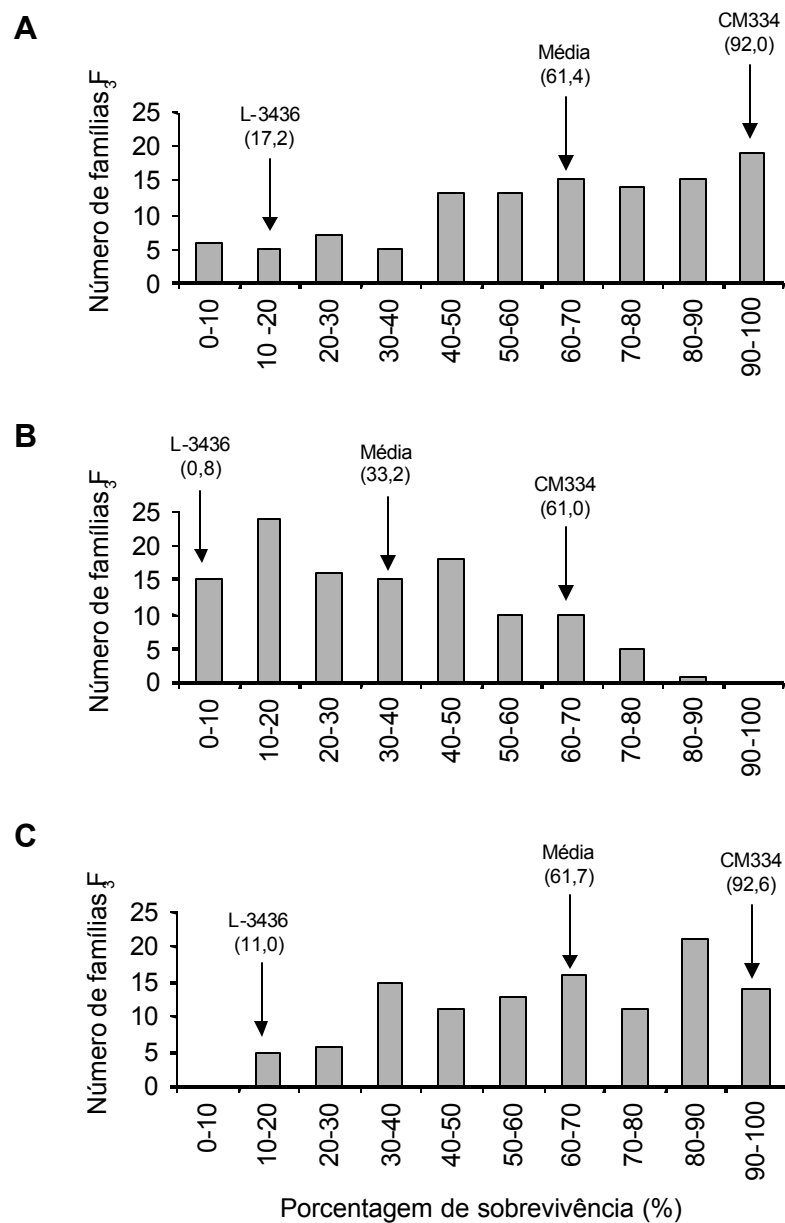


Figura 7 - Distribuições de freqüência de porcentagem de sobrevivência à inoculação com *Phytophthora capsici* via solo em 114 famílias F₃, em três experimentos independentes. A - Experimento 1; B - Experimento 2; C - Experimento 3.

Quadro 10 – Famílias F₃ que apresentaram comportamento transgressivo, com porcentagens de sobrevivência superiores às observadas em CM334 em inoculações com *Phytophthora capsici*

Transgressivas nas três inoculações:				
Família	Inoculação	Nº de plantas inoculadas	% sobreviv. ²	% sob. CM334 ³
13	1	11	100,00	91,98
	2	22 e 15 ¹	73,18	61,00
	3	11 e 24	100,00	92,61
37	1	26	100,00	91,98
	2	29 e 37	61,62	61,00
	3	31 e 20	95,16	92,61
51	1	31	93,5	91,98
	2	29 e 21	88,75	61,00
	3	20 e 25	98,00	92,61
Transgressivas em duas inoculações:				
Família	Inoculação	Nº de plantas inoculadas	% sobreviv. ²	%sob. CM334 ³
22	1	25	76,00	91,98
	2	22 e 28	73,21	61,00
	3	17 e 19	97,06	92,61
28	1	33	100,00	91,98
	2	25 e 23	41,91	61,00
	3	17 e 15	97,06	92,61
62	1	38	84,20	91,98
	2	27 e 21	67,20	61,00
	3	16 e 18	97,22	92,61
66	1	16	100,00	91,98
	2	15 e 16	54,79	61,00
	3	14 e 11	95,46	92,61
86	1	29	79,3	91,98
	2	19 e 28	72,37	61,00
	3	15 e 15	93,33	92,61

Quadro 10, Cont.

Família	Inoculação	Nº de plantas inoculadas	% sobreviv. ²	%sob. CM334 ³
96	1	24	95,8	91,98
	2	35 e 30	63,81	61,00
	3	15 e 27	89,63	92,61
Transgressivas em uma inoculação e com sobrevivência alta nas outras duas:				
Família	Inoculação	Nº de plantas inoculadas	% sobreviv. ²	%sob. CM334 ³
18	1	30	83,3	91,98
	2	30 e 24	75,42	61,00
	3	17 e 22	72,33	92,61
21	1	32	93,8	91,98
	2	20 e 26	41,15	61,00
	3	14 e 18	80,56	92,61
24	1	25	92	91,98
	2	19 e 20	50,92	61,00
	3	14 e 19	72,56	92,61
39	1	25	84	91,98
	2	27 e 23	43,96	61,00
	3	26 e 19	96,15	92,61
50	1	28	92,9	91,98
	2	35 e 22	58,44	61,00
	3	18 e 20	86,94	92,61
63	1	29	96,6	91,98
	2	30 e 17	51,47	61,00
	3	20 e 21	85,12	92,61
70	1	33	84,80	91,98
	2	30 e 28	66,07	61,00
	3	12 e 22	76,51	92,61
84	1	21	100,00	91,98
	2	19 e 13	57,29	61,00

Quadro 10, Cont.

Família	Inoculação	Nº de plantas inoculadas	% sobrev. ²	%sob. CM334 ³
	3	-	Não avaliado	92,61
91	1	29	96,6	91,98
	2	36 e 27	57,87	61,00
	3	21 e 13	73,63	92,61
100	1	34	73,5	91,98
	2	32 e 25	76,81	61,00
	3	19 e 20	61,71	92,61
110	1	38	100	91,98
	2	27 e 32	59,03	61,00
	3	31 e 17	84,73	92,61
112	1	24	70,8	91,98
	2	22 e 21	41,67	61,00
	3	21 e 16	94,49	92,61

¹Repetição 1 e repetição 2, respectivamente.

²Médias de duas repetições para inoculações 2 e 3.

³Médias de 19, 12 e 9 repetições para inoculações 1,2 e 3, respectivamente.

significativos nas inoculações 2 e 3, enquanto no grupo 2L estes foram detectados nas inoculações 1 e 3. Outras associações significativas nos grupos de ligação 12C (inoculação 1), 3C (inoculação 2), 5C, 3L e o marcador não-ligado F15_900 (inoculação 3) foram detectadas em apenas um dos experimentos (Quadro 11).

De acordo com o coeficiente de determinação (R^2), a porcentagem da variância fenotípica explicada por cada marcador variou de 9% a 24%. Foram detectados QTLs de ambos os progenitores. Nos grupos 2C, 2L e 4L, os alelos favoráveis vieram de L-3436, enquanto para os demais os alelos que conferem maior sobrevivência foram herdados de CM334.

Quadro 11 – Marcadores significativamente associados à resistência a *Phytophthora capsici* detectados por meio de regressão linear simples ($P < 5 \times 10^{-3}$). A classe mais resistente é apresentada em negrito

CONJUNTO C						
Experimento	Marcador	Grupo de Ligação	P	R ²	Médias de sobrevivência (%)	
					Homozigoto CM334 (AA)	Pelo menos um alelo de L-3436 (a ₋)
Inoculação 1	I15_300	2C	2,0x10 ⁻⁵	0,18	46,65	66,34
	F16_1300	2C	10 ⁻⁴	0,17	48,06	66,30
	M18_750	2C	1,9x10 ⁻³	0,11	49,95	65,06
	AB07_1300	2C	10 ⁻⁴	0,16	46,64	65,67
	AR10_420	2C	10 ⁻⁵	0,19	43,95	65,69
	AB07_1600	2C	10 ⁻⁴	0,16	45,64	65,28
	AT12_980, V12_800	2C	7,0x10 ⁻⁴	0,13	46,49	64,66
	AU05_1200	12C	2,3x10 ⁻³	0,11	71,67	57,49
Inoculação 2	AR10_420	2C	3,0x10 ⁻⁵	0,17	20,55	36,39
	AB07_1600	2C	1,5x10 ⁻⁴	0,15	21,51	36,15
	AT12_980, V12_800	2C	2,3x10 ⁻⁴	0,14	21,13	35,92
	M04_650	3C	5,0x10 ⁻⁴	0,13	42,81	30,03
	AK04_750	10C	2,0x10 ⁻³	0,11	40,92	30,05
	A17_700	10C	8,6x10 ⁻⁴	0,12	41,27	29,76
	AS10_490	10C	4,1x10 ⁻³	0,09	40,51	30,25
	W19_650	11C	9,6x10 ⁻⁴	0,12	42,54	30,10
Inoculação 3	F16_1300	2C	7,0x10 ⁻⁴	0,13	52,36	65,83
	M18_750	2C	2,0x10 ⁻³	0,11	52,49	65,31
	AB07_1300	2C	3,0x10 ⁻⁴	0,14	50,27	65,52
	AR10_420	2C	10 ⁻⁵	0,19	47,11	65,82
	AB07_1600	2C	10 ⁻⁴	0,16	48,12	65,56
	AT12_980, V12_800	2C	2,0x10 ⁻⁵	0,18	45,85	65,27
	Z18_1000	5C	6,0x10 ⁻⁴	0,13	71,66	57,89
	AD16_220	5C	2,3x10 ⁻³	0,11	70,38	58,32
	M05_490	5C	1,3x10 ⁻³	0,12	70,95	58,16
	AK04_750	10C	8,8x10 ⁻⁴	0,12	71,43	58,20
	A17_700	10C	1,9x10 ⁻⁴	0,15	72,16	57,23
	AS10_490	10C	7,8x10 ⁻⁴	0,12	71,38	57,73
	W19_650	11C	3,6x10 ⁻⁴	0,14	73,59	58,34

Quadro 11, Cont.

CONJUNTO L						
Experimento	Marcador	Grupo de Ligação	P	R ²	Médias de sobrevivência (%)	
					Pelo menos um alelo de CM334 (A ₋)	Homozigoto L-3436 (aa)
Inoculação 1	V02_1000	2L	1,5x10 ⁻³	0,11	57,69	73,16
	M04_1200	2L	<10 ⁻⁵	0,24	55,48	78,63
	AR17_730	2L	10 ⁻⁴	0,15	57,62	76,96
	AD16_490, B03_1150	2L	9,0x10 ⁻⁵	0,16	57,32	76,43
	K18_1500	2L	5,0x10 ⁻⁵	0,17	57,32	77,29
	Q08_1300	11L	6,0x10 ⁻⁵	0,16	66,38	48,45
	Q04_2200	11L	3,0x10 ⁻⁵	0,17	66,43	47,71
Inoculação 2	V01_700	4L	6,0x10 ⁻⁵	0,16	30,10	45,45
	AK04_450, AT15_600, K09_1800, I15_1800	4L	10 ⁻⁵	0,18	29,93	46,12
	AE10_450, AM11_300, T17_700	4L	10 ⁻⁴	0,16	30,00	45,19
	P13_900	4L	5,1x10 ⁻⁴	0,13	30,38	43,75
	W14_500	4L	1,9x10 ⁻³	0,11	30,57	42,55
	J10_800	4L	1,7x10 ⁻³	0,11	30,55	42,62
	Q08_1300	11L	10 ⁻⁵	0,19	37,35	22,06
	Q04_2200	11L	<10 ⁻⁵	0,20	37,41	21,40
	Inoculação 3	M04_1200	2L	9,5x10 ⁻⁴	0,12	58,87
K18_1500		2L	4,3x10 ⁻³	0,10	59,38	72,63
M11_1600		3L	9,4x10 ⁻⁴	0,12	65,66	52,37
AR17_750		3L	2,6x10 ⁻³	0,10	65,16	52,44
V01_700		4L	2,5x10 ⁻⁴	0,14	58,68	74,76
AK04_450, AT15_600, K09_1800, I15_1800		4L	2,0x10 ⁻⁴	0,15	58,64	74,93
AE10_450, AM11_300, T17_700		4L	10 ⁻⁴	0,16	58,31	75,45
P13_900		4L	1,4x10 ⁻⁴	0,14	58,04	74,78
AE04_750		4L	3,6x10 ⁻⁴	0,14	58,67	74,12
W14_500		4L	4,7x10 ⁻³	0,09	59,19	71,71

Quadro 11, Cont.

CONJUNTO L						
Experimento	Marcador	Grupo de Ligação	P	R ²	Médias de sobrevivência (%)	
					Pelo menos um alelo de CM334 (A_)	Homozigoto L-3436 (aa)
	J10_800	4L	5,0x10 ⁻⁴	0,13	58,23	73,48
	Q08_1300	11L	7,2x10 ⁻⁴	0,12	65,73	52,19
	Q04_2200	11L	1,2x10 ⁻⁴	0,15	66,08	50,78
	F15_900	Não ligado	2,0x10 ⁻³	0,11	65,15	52,01

Os marcadores significativos para cada experimento foram avaliados em um modelo de regressão múltipla utilizando “stepwise elimination”. Os marcadores que permaneceram no modelo são apresentados no Quadro 12. Cada grupo de ligação ficou representado por apenas um marcador, o que sugere que, em cada grupo, os demais marcadores significativos deveriam estar associados ao mesmo QTL representado pelo marcador que permaneceu no modelo. Da mesma forma, os marcadores nos grupos homólogos 11C e 11L podem estar associados a um mesmo QTL, pois nos experimentos 2 e 3, em que ambos apresentaram marcadores significativos, apenas 11L permaneceu no modelo. O mesmo raciocínio se aplica para os grupos 2C e 2L no experimento 3, mas não no experimento 1. Os marcadores em grupos de ligação não-representados no Quadro 12 (2L, 3L e F15_900 não-ligado, todos na inoculação 3) foram provavelmente excluídos por apresentarem contribuição reduzida para o modelo. De acordo com o R² de cada modelo, os marcadores explicaram 27% da variância fenotípica para a inoculação 1, 39% para a inoculação 2 e 31,6% para a inoculação 3.

A porcentagem da variância fenotípica explicada pelos modelos é bem menor do que seria esperado pelos efeitos individuais de cada marcador, o que pode ser uma indicação de interações epistáticas entre os QTLs associados com a resistência a *P. capsici* (WANG et al., 1994).

Quadro 12 – Marcadores associados à resistência a *P. capsici* após análise de regressão múltipla utilizando o modelo de eliminação “stepwise”

Marcador	Grupo de Ligação	F	P	R ²
Inoculação 1				
AR10_420	2C	12,51	10 ⁻⁵	0,19
M04_1200	2L	17,38	<10 ⁻⁵	0,24
Q08_1300	11L	10,63	6,0x10 ⁻⁵	0,16
AU05_1200	12C	6,41	2,3x10 ⁻³	0,11
Modelo		11,2	<10 ⁻⁴	0,27
Inoculação 2				
AR10_420	2C	11,33	3,0x10 ⁻⁵	0,17
M04_650	3C	8,18	5,0x10 ⁻⁴	0,13
K09_1800	4L	11,91	10 ⁻⁵	0,18
A17_700	10C	7,53	8,6x10 ⁻⁴	0,12
Q04_2200	11L	14,26	<10 ⁻⁵	0,20
Modelo		14,42	<10 ⁻⁴	0,39
Inoculação 3				
AR10_420	2C	12,53	10 ⁻⁵	0,19
K09_1800	4L	9,24	2,0x10 ⁻⁴	0,15
A17_700	10C	9,25	1,9x10 ⁻⁴	0,15
Q04_2200	11L	9,85	1,2x10 ⁻⁴	0,15
Modelo		13,45	<10 ⁻⁴	0,30

A análise de intervalo no programa MAPMAKER/QTL revelou a presença de regiões significativamente associadas com a resistência que correspondem aos marcadores significativos detectados na análise de regressão, exceto para o grupo 3L, que ficou pouco acima do limite de significância na inoculação 2 pela análise de regressão (marcador N03_1300 – $p = 7,6 \times 10^{-3}$) (Quadro 13). Detectaram-se regiões significativas nos grupos 2C, 2L, 4L, 11C e 11L nos três experimentos, com porcentagem da variância explicada (PVE) variando de 15,9 a 65,4% para 2C, de 50,4 a 56,3% para 2L, de 9,2 a 45,6% para 4L, de 39,7 a 56,3% para 11C e de 9,4 a 38,7% para 11L. QTLs em 12C, 3L e 5C foram detectados em apenas um dos experimentos, da mesma forma que na análise de regressão, embora nesta última os marcadores do grupo 3L tenham sido significativos na inoculação 3. Todos apresentaram altos valores de PVE. O marcador M04_650, do grupo 3C, e o marcador não ligado F15_900, significativos na análise de regressão, não foram testados por estarem fora do mapa “framework”. Apenas no grupo 2C suspeitou-se da presença de mais de um QTL, pela presença de dois picos. Entretanto, utilizando mapeamento de intervalo composto no programa QTL Cartographer (BASTEN et al., 1999) detectou-se apenas um pico em todos os experimentos, com LOD 5,2, 3 e 3 e $R^2(\%)$ 23, 16 e 9,2, para as inoculações 1, 2 e 3, respectivamente.

Modelos incluindo as regiões significativas em cada inoculação (apenas a mais significativa de cada par de grupos homólogos) apresentaram LOD = 14,32 e PVE = 95,1% para inoculação 1, LOD = 10,3 e PVE = 69,1% para inoculação 2 e LOD = 6,3 e PVE = 79,4% para a inoculação 3. Utilizando apenas as regiões correspondentes aos marcadores selecionados pela regressão múltipla (Quadro 12), obtiveram-se LOD = 12,97 e PVE = 87,8% para inoculação 1, LOD = 12,3 e PVE = 62,8% para a inoculação 2 e LOD = 8,82 e PVE = 47,2% para a inoculação 3. Esses resultados sugerem que há regiões de grande efeito sobre a resistência e que o conjunto dessas regiões explica grande parte da variância fenotípica.

Quadro 13 – QTLs afetando a porcentagem de sobrevivência de 114 famílias F₃ de *Capsicum annuum* do cruzamento L-3436 x CM334 após inoculação com *P. capsici*, em três experimentos distintos, detectados por análise de intervalo implementada pelo programa Mapmaker/QTL

Grupo de Ligação	Intervalo	Posição (cM)	LOD score	PVE (%) ¹
Inoculação 1				
2C	AB07_1600 – AR10_420	4	3,0	15,9
2L	AD16_490 – M04_1200	6	4,9	50,4
4L	W14_500 – AE04_750	8	2,3	45,6
11C	K09_1250 – W19_650	0	3,0	50,1
11L	Q04_2200 – Q08_1300	0	2,4	9,4
12C	Z12_2050 – AU05_1200	26	3,3	47,5
Inoculação 2				
2C	AB07_1600 – AR10_420	4	2,8	46,4
2L	AD16_490 – M04_1200	6	3,6	54,4
3L	N03_1300 – M11_1600	0	3,3	44,6
4L	V01_700 – AQ13_780	0	2,6	11,5
11C	K09_1250 – W19_650	12	2,3	39,7
11L	Q04_2200 – Q08_1300	0	3,0	11,3
Inoculação 3				
2C	U11_1300 – AB07_1600	10	3,9	65,4
2L	AD16_490 – M04_1200	6	3,8	56,3
4L	AE04_750 – V01_700	4	2,2	9,2
5C	V14_1100 – Z18_1000	24	3,1	62,9
11C	K09_1250 – W19_650	11	4,1	56,3
11L	Q04_2200 – Q08_1300	0	2,8	38,7

¹Porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL.

3.8. Possibilidades de predição da sobrevivência das famílias F₃ com base no fenótipo molecular das plantas F₂

Trabalhando com marcadores dominantes, não é possível estimar os efeitos aditivos e de dominância dos QTLs e não se conhece o número de alelos de um determinado progenitor em uma planta que apresenta o fragmento amplificado em estudo (pode ter um ou dois alelos do progenitor em que o fragmento é amplificado e nenhum ou um alelo do outro progenitor). A distância entre o marcador significativo e o loco que contribui para a resistência não é conhecida. Quanto maior for essa distância, maior a recombinação entre o marcador e o loco e maior a chance de erro ao se inferir a performance da planta com base no genótipo do marcador. Entretanto, a análise dos dados para os marcadores significativos nos grupos homólogos de ligação 2, 4, 10 e 11, que foram detectados em pelo menos dois experimentos independentes e foram mantidos no modelo de regressão múltipla, permitiu algumas conclusões. Nos parágrafos abaixo, serão mencionados os genótipos inferidos por meio dos marcadores como se fossem os genótipos dos QTLs. Embora isso possa não ser verdade em alguns casos, em função de eventos de recombinação entre o marcador e o QTL, adotou-se essa simplificação para facilitar a discussão e não ter que repetir essa observação a todo momento.

Os dois QTLs que foram significativos nas três inoculações, os dos grupos de ligação 2 e 11, parecem ser de grande importância para a expressão da resistência. Considerando que os marcadores dos grupos de ligação 2C e 2L estejam associados ao mesmo QTL, e adotando o mesmo raciocínio para os dos grupos 11C e 11L, nota-se que entre os indivíduos com maior nível de resistência na população avaliada, todos tinham pelo menos um alelo favorável para esses dois QTLs, à exceção da planta 50, que não possuía alelo favorável no QTL do grupo 2 mas apresentava-se em homozigose para os alelos favoráveis nos QTLs dos grupos 4, 10 e 11 (Quadro 14). Já entre os mais suscetíveis, apenas duas plantas em 14 apresentavam um alelo favorável em ambos os QTLs. As demais apresentavam nenhum alelo favorável em ambos (5 plantas) ou um alelo favorável em apenas um deles (7 plantas) (Quadro 15). Em toda a população, oito plantas não possuíam alelos de resistência nesses dois QTLs, e todas apresentaram baixas porcentagens de

Quadro 14 – Fenótipos moleculares das plantas E₃ cujas famílias de autofecundação (F₃) apresentaram maiores porcentagens de sobrevivência em três experimentos independentes. Estão representados os grupos de ligação com marcadores significativamente associados à resistência em pelo menos dois experimentos. A letra C indica presença de fragmento amplificado em L-3436 (genótipo a₁). A letra A indica ausência desse fragmento (genótipo AA, homocigoto para o alelo de CM334 nesse loco marcador). Da mesma forma, D indica presença de fragmento amplificado em CM334 (genótipo A₂) e B indica sua ausência (aa, homocigoto para o alelo de L-3436 nesse loco marcador). Os marcadores utilizados para essa análise foram: Grupo 2C: AR10_420, AB07_1600, AT12_980; 2L: M04_1200, K18_1500; 3C: M04_650; 3L: M11_1600, AR17_750; 4L: V01_700, AE04_750, W14_500; 10C: AK04_750, A17_700, AS10_490; 11C: W19_650; 11L: Q08_1300, Q04_2200. Em cada grupo, quando um indivíduo apresentou o fenótipo molecular mais favorável à expressão da resistência, este foi apresentado em negrito

Planta / Família	Grupo de Ligação						Porcentagem de Sobrevivência		
	2C	2L	4L	10C	11C	11L	Inoc. 1	Inoc. 2	Inoc. 3
13	C	B	B	C	C	D	100	73,2	100
22	C	D	D	C	A	D	76,0	73,2	97,1
28	C	B	D	A	C	D	100,0	41,9	97,1
37	C	D	D	A	A	D	100	61,6	95,2
50	A	D	B	A	A	D	92,9	58,4	86,9
51	C	D	B	A	C	D	93,5	88,8	98,0
62	C	B	B	C	C	D	84,2	67,2	97,2
63	C	D	B	A	A	D	96,6	51,5	85,1
66	C	D	D	C	C	D	100	54,8	95,5
84	C	B	D	A	C	D	100	57,3	-
86	C	D	B	A	A	D	79,3	72,4	93,3
96	C	D	D	A	A	D	95,8	63,8	89,6
110	C	B	D	C	A	D	100	59,0	84,7

Quadro 15 – Fenótipos moleculares das plantas F_2 cujas famílias de autofecundação (F_3) apresentaram menores porcentagens de sobrevivência em três experimentos independentes. Ver Quadro 14 para mais detalhes

Planta / Família	Grupo de Ligação						Porcentagem de Sobrevivência		
	2C	2L	4L	10C	11C	11L	Inoc. 1	Inoc. 2	Inoc. 3
7	C	D	D	C	C	D	0,0	13,0	37,5
12	A	D	D	C	C	B	4,3	2,6	19,2
19	C	D	D	C	C	B	34,8	15,2	27,7
20	A	D	B	C	C	D	20,7	8,1	11,0
30	C	D	D	C	C	B	28,6	9,5	31,6
31	C	D	D	C	C	D	26,1	10,5	38,7
35	C	D	D	A	C	B	0,0	5,2	24,3
41	A	D	D	C	C	B	31,4	23,5	37,4
55	A	D	D	C	C	D	40,0	17,7	24,5
60	A	D	D	C	C	B	26,9	3,8	4,4
68	A	D	D	C	C	B	10,7	9,1	38,6
101	C	D	D	C	C	B	8,3	0,0	31,1
103	A	D	D	C	C	B	28,6	7,7	24,3
104	C	D	D	C	C	B	8,1	5,0	13,0

sobrevivência em suas progênes F_3 (Quadro 16). O mesmo foi observado para plantas sem alelos de resistência no QTL do grupo 2 e com apenas um alelo favorável no do grupo 11 (Quadro 17).

Os QTLs dos grupos de ligação 4 e 10 parecem também ser importantes, pois apresentam-se com maior frequência em configuração favorável nos indivíduos mais resistentes que nos mais suscetíveis. As performances das plantas 13, 37 e 51, cujas progênes mostraram maiores

Quadro 16 – Plantas F₂ sem alelos favoráveis nos marcadores associados aos QTLs dos grupos 2 e 11 e as respectivas médias de sobrevivência de suas famílias F₃

Planta / Família	Porcentagem de sobrevivência		
	Inoculação 1	Inoculação 2	Inoculação 3
12	4,3	2,6	19,2
41	31,4	23,5	37,4
60	26,9	3,8	4,4
68	10,7	9,1	38,6
71	72,4	26,7	54,2
76	17,1	12,4	57,7
103	28,6	7,7	24,3
108	-	19,9	39,3
Média	27,3	13,21	34,4
Média da população	61,4	33,2	61,7
Redução (%)	55,5	60,21	44,2

Quadro 17 – Médias de sobrevivência de famílias F₃ originadas de plantas F₂ sem alelos favoráveis nos marcadores associados ao QTL do grupo 2 e com apenas um alelo favorável no QTL do grupo 11.

Planta / Família	Porcentagem de sobrevivência		
	Inoculação 1	Inoculação 2	Inoculação 3
5	56,3	20,3	35,4
20	20,7	8,1	11,0
38	50,0	40,5	76,4
42	44,8	10,4	80,9
55	40,0	17,7	24,5
57	14,7	12,4	73,6
65	69,0	20,0	39,1
90	50,0	32,0	35,8
106	68,0	30,4	37,8
Média	45,9	21,30	46,1
Média da população	61,4	33,2	61,7
Redução (%)	25,2	35,8	25,3

porcentagens de sobrevivência que CM334 em três experimentos independentes (Quadro 10), aparentemente podem ser explicadas pelo fenótipo molecular, apresentando os seguintes números prováveis de alelos de resistência nos grupos de ligação 2, 4, 10 e 11, respectivamente (Quadro 14): planta 13 - 2, 2, 0 ou 1, 1; planta 37 - 1, 0 ou 1, 2, 2; planta 51: 1, 2, 2, 1. As três possuíam alelos favoráveis em pelo menos três dos quatro QTLs, sempre incluindo os do grupo 2 e do grupo 11, com dois deles em homozigose. Da mesma forma, as demais plantas listadas no Quadro 14 apresentaram dois ou mais desses QTLs em homozigose, como pôde ser inferido pelos fenótipos dos marcadores, e alelos de resistência em pelo menos dois QTLs, mais comumente em três. As plantas 22 e 66 constituem exceções, com a 22 apresentando apenas um dos QTLs em homozigose e a 66 nenhum. A planta 22, entretanto, apresenta configuração favorável em quase todos os outros QTLs não considerados nesta análise (3C, 3L, 12C, F15_900 não-ligado), e a planta 66, em todos os outros (3C, 3L, 5C, 12C, F15_900 não-ligado), cujo efeito cumulativo pode ser a explicação para a boa performance dessas plantas. As 27 plantas da população que apresentaram pelo menos um alelo favorável em cada um dos QTLs dos grupos 2 e 11 e homozigose para um ou para ambos os QTLs dos grupos 4L e 10C mostraram altas porcentagens de sobrevivência (Quadro 18) . Plantas sem alelos de resistência no QTL do grupo 11 e heterozigotas no do grupo 2, ou plantas heterozigotas em ambos, e que não possuíam nenhum dos QTLs dos grupos 4 e 10 em homozigose, apresentaram baixas porcentagens de sobrevivência (Quadro 19). Essas observações sugerem que a resistência resulta da ação conjunta desses QTLs.

Quadro 18 – Médias de sobrevivência de famílias F₃ originadas de plantas F₂ com pelo menos um alelo favorável em cada um dos QTLs dos grupos 2 e 11 e com pelo menos um dos QTLs nos grupos 4L e 10C em homozigose para o alelo de resistência. Veja Quadro 14 para mais detalhes

Planta / Família	Grupo de Ligação						Porcentagem de Sobrevivência		
	2C	2L	11C	11L	4L	10C	Inoc. 1	Inoc. 2	Inoc. 3
6	C	D	A	D	B	A	57,9	52,9	83,0
13	C	B	C	D	B	C	100,0	73,2	100,0
24	C	B	C	D	D	A	92,0	50,9	72,6
25	C	D	C	D	D	A	84,4	65,7	79,0
28	C	B	C	D	D	A	100,0	41,9	97,1
37	C	D	A	D	D	A	100	60,6	95,2
39	C	B	C	D	D	A	84,0	44,0	96,2
46	C	D	A	D	B	C	74,2	46,0	80,4
51	C	D	C	D	B	A	93,5	88,8	98,0
52	C	D	C	D	B	C	82,9	17,8	71,6
62	C	B	C	D	B	C	84,2	67,2	97,2
63	C	D	A	D	B	A	96,6	51,5	85,1
64	C	D	C	D	B	C	87,9	65,7	86,5
69	C	B	C	D	B	C	71,9	39,4	91,4
70	C	B	A	D	B	C	84,8	66,1	76,5
78	C	B	C	D	D	A	75,0	46,7	83,9
82	C	D	A	D	B	A	72,4	38,2	95,5
84	C	B	C	D	D	A	100,0	57,3	-
86	C	D	A	D	B	A	79,3	72,4	93,3
92	C	D	A	D	B	C	55,2	44,9	58,3
95	C	D	C	D	D	A	47,1	62,2	86,1
96	C	D	A	D	D	A	95,8	63,8	89,6
99	C	D	C	D	D	A	81,2	19,6	61,8
100	C	D	C	D	D	A	73,5	76,8	61,7
105	C	D	C	D	B	C	42,3	36,5	85,6
109	C	B	C	D	B	C	66,7	47,8	88,1
112	C	B	C	D	D	A	70,8	41,7	94,5
Média							79,8	53,3	84,9
Média da população							61,4	33,2	61,7
Ganho por seleção (%)							30,0	60,5	37,6

Quadro 19 – Plantas F₂ heterozigotas para o QTL do grupo 2, heterozigotas ou sem alelo favorável para o QTL do grupo 11 e não homozigotas para os QTLs dos grupos 4L e 10C

Planta	11L	Sobrevivência (%)		
		Inoculação 1	Inoculação 2	Inoculação 3
7	D	0,0	13,0	37,5
11	D	44,4	36,6	41,4
14	D	64,7	12,8	54,0
15	D	60,0	24,3	35,0
19	B	34,8	15,2	27,7
29	D	4,2	18,6	34,4
30	B	28,6	9,5	31,6
31	D	26,1	10,5	38,7
34	D	66,7	53,2	84,4
35	B	0,0	5,2	24,3
43	D	39,1	47,9	66,9
49	D	38,2	27,7	16,0
54	D	48,5	11,5	36,1
66	D	100	54,8	95,5
74	D	57,7	26,8	25,0
87	B	26,7	22,2	43,2
88	D	55,6	11,9	64,0
91	B	96,6	57,9	73,6
93	B	54,5	10,3	42,4
94	D	57,1	30,3	83,3
98	D	52,4	17,5	59,5
101	B	8,3	0,0	31,1
104	B	8,1	5,0	13,0
113	D	48,4	19,2	64,4
114	B	44,0	10,0	61,4
Média		42,6	22,1	47,4
Média da população		61,4	33,2	61,7
Redução (%)		30,6	33,4	30,2

4. DISCUSSÃO

4.1. Resistência dos parentais a *P. capsici*

Seguindo a sugestão de MATSUOKA et al. (1984), optou-se por trabalhar com uma mistura de três isolados esporulantes para evitar problemas de perda de capacidade de esporulação ou de redução de patogenicidade, que poderiam atrasar os trabalhos caso se utilizasse um único isolado. Esses autores observaram que para 28 isolados diferentes coletados no Estado de Minas Gerais não houve interação diferencial genótipo x isolado em inoculações no suscetível 'Ikeda' e na linhagem resistente derivada de BGH 176 ('Santaka'). Estudos realizados em diversos países com diferentes isolados sugerem que a resistência de CM334 é de amplo espectro e que não há interação diferencial, pois não se conhece relatos de quebra da resistência (Redondo, citado por GUERRERO-MORENO e LABORDE, 1980; PALLOIX et al., 1990; GIL ORTEGA et al., 1992, 1995; WALKER e BOSLAND, 1999; KOBORI et al., 2000).

Embora outros autores tenham estudado o efeito de diferentes concentrações de inóculo na avaliação de resistência a *P. capsici*, esses estudos ou foram realizados com outras fontes de resistência (MATSUOKA et al., 1984; REIFSCHNEIDER et al., 1986) ou demonstraram que a efetividade de determinada concentração depende da agressividade do isolado utilizado (PALLOIX et al., 1988; GIL ORTEGA et al., 1995). Assim, realizou-se um teste com diferentes concentrações de zoósporos da mistura de isolados utilizada neste trabalho.

Concentrações iguais ou inferiores a 10^3 zoósporos/mL não resultaram em alta incidência de doença nas variedades suscetíveis L-3513 e California Wonder em inoculações no colo e raízes. Resultado semelhante foi obtido por REIFSCHNEIDER et al. (1986), que só obtiveram 100% de mortalidade em variedades suscetíveis com concentrações de 10^4 zoósporos/mL ou superiores. Da mesma forma, ANSANI e MATSUOKA (1983) e MATSUOKA et al. (1984) relataram que pelo menos 10^4 zoósporos/planta são necessários para evitar escapes.

Algumas plantas de CM334 apresentaram doença em inoculações via solo, fato também relatado por outros autores (BANJA, 1989; GIL ORTEGA et al., 1992, 1995), sempre em níveis baixos, mas não por outros (REIFSCHNEIDER et al., 1992; WALKER e BOSLAND, 1999). Essas diferenças podem ocorrer em função de variações nas condições de inoculação, como a idade das plantas (MATSUOKA et al., 1984; REIFCHNEIDER et al., 1986; KIM et al., 1989), a concentração de inóculo (MATSUOKA et al., 1984; REIFCHNEIDER et al., 1986; GIL ORTEGA et al., 1986, 1995; PALLOIX et al., 1988), a agressividade do isolado utilizado (GIL ORTEGA et al., 1986, 1995; PALLOIX et al., 1988), bem como a umidade do solo (Gil Ortega, 1990, citado por GIL ORTEGA et al., 1992). GIL ORTEGA et al. (1992) demonstraram que a mortalidade em CM334 não é explicada por variações genéticas dentro da linhagem, pois quando utilizaram a parte superior de plantas de CM334 com sintomas para a enxertia em plantas saudáveis, as progênies dessas plantas mostraram-se resistentes. Da mesma forma, variações de suscetibilidade entre plantas F_1 , que deveriam ser geneticamente homogêneas, parecem não ter causa genética, pois não houve resposta à seleção (GIL ORTEGA et al., 1991).

A diferença observada entre L-3513 e L-3436 quanto à incidência de doença aos 3 dias após a inoculação com 10^4 zoósporos/mL (95% vs. 30%) e a redução dessa diferença com o tempo estão de acordo com as observações de LEITE (1999). A

linhagem L-3436 no presente trabalho comportou-se de forma semelhante à variedade Jalapeño no trabalho de KIMBLE e GROGAN (1960) e à linhagem CNPH 40 no trabalho de REIFSCHNEIDER et al. (1986), atrasando o desenvolvimento e o progresso da doença. REIFSCHNEIDER et al. (1986) sugerem que a combinação dessa resistência parcial com uma de maior efeito, como a de CM334, poderia produzir uma resistência superior à obtida com qualquer um dos dois tipos sozinho.

O acesso CM334 foi resistente à inoculação da parte aérea, mas algumas plantas apresentaram necrose na gema apical e folhas adjacentes. Lesões apicais em plantas resistentes, semelhantes às aqui observadas em CM334, foram relatadas por BARKSDALE et al. (1984). Estes autores sugerem que a configuração das folhas jovens no ápice favorece o acúmulo de suspensão de inóculo nessa região e que, após a retirada da câmara de nevoeiro, permite um período de molhamento adicional. Outra possibilidade é que tecidos mais jovens sejam também mais suscetíveis, como observado em mudas inoculadas em diferentes idades, que são mais suscetíveis quando mais jovens (MATSUOKA et al., 1984; REIFSCHNEIDER et al., 1986; KIM et al., 1989).

Nos dois experimentos de inoculação da parte aérea, a nota média para California Wonder superou 4, o que caracteriza claramente uma reação de suscetibilidade. Porém, nove plantas em 63 inoculadas no experimento 1 (14,3%) e oito plantas em 70 inoculadas no experimento 2 (11,4%) apresentaram nota igual ou inferior a 2, o que permitiria classificá-las como resistentes. Escapes em inoculações por atomização da parte aérea foram também observados por REIFSCHNEIDER et al. (1986). Em estudos futuros, para obter 100% de mortalidade em California Wonder em inoculações da parte aérea, pode-se inocular plantas mais jovens, como no experimento com duas concentrações de inóculo, em que se obteve 100% de mortalidade mesmo para L-3436 quando inoculado aos 30 dias após a semeadura; ou aumentar a concentração de inóculo, mas neste caso seriam necessários novos testes para verificar se não haveria efeito sobre CM334. MATSUOKA et al. (1984) utilizaram 5×10^4 zoósporos/mL.

Os níveis de suscetibilidade observados na parte aérea estão de acordo com os observados no colo e raízes. Resultados semelhantes foram obtidos por BARKSDALE et al. (1984), que demonstraram que linhagens resistentes à podridão do colo e raízes, como PI201232, P51 e Fyuco, foram também resistentes à queima foliar. Da mesma forma, estes autores relataram que linhagens classificadas como suscetíveis na

inoculação por atomização foram também suscetíveis na inoculação via solo. Uma exceção foi PI260537, que apresentou suscetibilidade na parte aérea e resistência no colo e raízes (BARKSDALE et al., 1984). MATSUOKA et al. (1984) também selecionaram linhagens com altos níveis de resistência no colo e raízes e resistência apenas mediana na parte aérea. O cultivar resistente Paladin, lançado nos Estados Unidos pela Novartis Seeds Inc., embora possuísse alta resistência no colo e raízes, não possuía resistência na parte aérea, exigindo aplicações periódicas de fungicidas cúpricos do meio até o final do ciclo da cultura em regiões com alta pluviosidade (RISTAINO e JOHNSTON, 1999). Esse fato demonstra a importância para o melhoramento de se utilizar fontes com resistência de colo e raiz e de parte aérea. Diferenças de suscetibilidade entre colo e raiz e parte aérea, como relatados acima, sugerem que o controle genético da resistência nessas duas regiões pode ser diferente.

Neste trabalho foi demonstrado o alto nível de resistência da parte aérea de CM334, confirmando os resultados obtidos anteriormente por ALCANTARA e BOSLAND (1994) e WALKER e BOSLAND (1999) em inoculações de folhas com microgotas, bem com o potencial de CM334 como fonte de resistência a *P. capsici*. WALKER e BOSLAND (1999), entretanto, ao inocularem separadamente clones das mesmas plantas nas folhas ou nas raízes e colo, mostraram que genes diferentes controlam a resistência de CM334 em cada uma dessas regiões, sendo necessário um gene dominante para a resistência nas folhas e outro gene dominante para a resistência de colo e raízes. Um gene adicional é necessário para a expressão da resistência nos dois sistemas, mas não confere resistência sozinho, tendo sido herdado de CM334 no cruzamento com o cv. suscetível Keystone e aparentemente já estando presente no cultivar suscetível Early Jalapeño. Assim, aparentemente serão necessárias também inoculações de parte aérea ao longo de um programa de melhoramento para se obter cultivares com resistência de colo e raiz e parte aérea a partir de CM334.

4.2. Avaliação da resistência em progênies de cruzamentos de CM334 com as linhagens L-3513 e L-3436 e com o cultivar California Wonder

A constatação de um gradiente de suscetibilidade (L-3513 > California Wonder > L-3436) permitiu testar a efetividade da resistência de CM334

quando combinada com 'backgrounds' genéticos apresentando diferentes níveis de resistência. Experimentos com os híbridos F_1 , F_2 e retrocruzamentos demonstraram que a performance das progênies é dependente do parental suscetível, que contribui efetivamente para a resistência. Esse fato foi também relatado por WALKER e BOSLAND (1999) quando compararam os cruzamentos de CM334 com o cv. Keystone e com o cv. Early Jalapeño. No cruzamento com o primeiro, aparentemente dois genes dominantes complementares eram necessários para a resistência, enquanto para o cruzamento com o segundo, observou-se uma herança monogênica, possivelmente em razão do cv. Early Jalapeño já apresentar um dos genes necessários, mas que sozinho não é suficiente para conferir resistência a esse cultivar. Da mesma forma que o observado para L-3436 neste trabalho, KIMBLE e GROGAN (1960) relataram um nível de resistência intermediário no cv. Jalapeño. Assim, a combinação de resistência parcial como a de L-3436 com uma resistência de maior efeito, como a de CM334, favorece a obtenção de indivíduos resistentes nas gerações subsequentes.

Observou-se maior incidência de doença em experimentos realizados com plantas em idades inferiores a 36 dias após a semeadura. Em termos práticos, a avaliação de resistência em plantas com 45 ou mais dias após a semeadura é mais útil. A produção de mudas de pimentão é feita em canteiros ou recipientes, em substrato que pode ser facilmente desinfestado. As mudas são transplantadas quando estão com quatro a seis folhas definitivas ou 10 a 15 cm de altura, o que acontece a cerca de 40 dias após a germinação (REIFSCHNEIDER, 2000), ou seja, 45 a 47 dias após a semeadura, idade em que a resistência derivada de CM334 mostra-se mais efetiva. Maior ênfase deve ser dada, pois, à resistência das plantas à idade em que estas serão levadas ao campo, quando se torna difícil impedir o contato destas com o patógeno em áreas infestadas.

Os resultados de segregação dos experimentos em bandejas não puderam ser explicados por nenhum dos modelos previamente propostos para a herança da resistência a *P. capsici* em CM334 e nem pelos modelos propostos para outras fontes de resistência por SARAIVA (1982). Outros autores que realizaram experimentos em bandejas sob condições semelhantes de densidade de plantas e com idades próximas às utilizadas aqui também

tiveram dificuldades para explicar seus resultados, formulando hipóteses complexas envolvendo pelo menos três genes e apresentando resultados para algumas gerações que não puderam ser explicados pelos modelos propostos (SARAIVA, 1982; GIL-ORTEGA et al., 1991). Entretanto, autores que trabalharam com plantas inoculadas individualmente em idades superiores a 43-45 dias após a semeadura, em bandejas com 4 linhas de plantio mas apenas 5 plantas/linha (BANJA, 1989) ou 7 a 8 plantas/linha (REIFSCHNEIDER et al., 1992), ou plantas bem espaçadas em células individuais (WALKER e BOSLAND, 1999), propuseram modelos mais simples, como dois genes com epistasia dominante e recessiva (BANJA, 1989; REIFSCHNEIDER et al., 1992) e um gene dominante ou dois genes dominantes complementares, dependendo do suscetível utilizado (WALKER e BOSLAND, 1999). Além da idade, o maior desenvolvimento das plantas, principalmente em diâmetro, e o seu maior vigor, quando avaliadas em condições de plantio menos adensado, parecem favorecer a ação dos genes de resistência, gerando padrões de segregação que podem ser explicados com hipóteses mais simples. Já em plantas mais novas e, ou, menos desenvolvidas e vigorosas em função de maior adensamento, os genes de resistência parecem ser menos efetivos em prevenir a incidência de doença e a morte das plantas, apresentando um efeito apenas parcial e dificultando a interpretação dos resultados. De fato, em plantas do cruzamento entre CM334 e L-3436 com idade superior a 44 dias inoculadas individualmente em copos plásticos de 500 mL foi possível estabelecer um modelo simples para a herança da resistência, com dois genes dominantes independentes, cada um herdado de um dos parentais, apesar dos resultados pouco esclarecedores obtidos nos experimentos em bandejas. A resistência de L-3436, de pouco efeito nos experimentos em bandejas, propiciou a essa linhagem alta sobrevivência (84%) no experimento em copos plásticos.

Os resultados obtidos demonstram que, nas condições de inoculação em bandeja aqui utilizadas, só é viável fazer seleção para resistência diretamente em populações de retrocruzamento com o parental recorrente se este apresentar um certo nível de resistência, como L-3436. Nesse caso, uma boa estratégia pode ser inocular um bom número de plantas originadas de retrocruzamento com L-3436, selecionar as resistentes e deixá-las

autofecundar ao menos mais uma geração, efetuar nova seleção e então realizar novo retrocruzamento. A autofecundação aumenta as chances de se obter genótipos com maior número de alelos de resistência. Após alguns ciclos de retrocruzamento/seleção/autofecundação/seleção, o cruzamento entre linhagens resistentes selecionadas pode conduzir à obtenção de indivíduos transgressivos, principalmente após um ciclo adicional de autofecundação e seleção. A utilização de testes de progênie seria desejável para selecionar indivíduos com maiores chances de estarem em homozigose para os locos de resistência, para os quais seriam colhidas sementes de retrocruzamento para dar continuidade ao processo. Já para cruzamentos de CM334 com parentais como L-3513 ou California Wonder, deve-se conduzir a população de retrocruzamento por uma ou duas gerações de autofecundação, pelo menos, para só então se efetuarem inoculações para a seleção de genótipos resistentes, pois inoculando-se diretamente a população de retrocruzamento nenhuma ou poucas plantas sobrevivem. Resultados similares foram observados por GIL ORTEGA et al. (1991), que não encontraram sequer uma planta resistente em 1.760 plantas originadas de autofecundação de 20 plantas do terceiro retrocruzamento (BC3S1) do cruzamento entre CM334 e o suscetível 'Morrón INIA 224'. Talvez a chance de sucesso fosse maior se os autores efetuassem uma seleção em RC_1F_2 ou RC_1F_3 , quando havia maior proporção do genoma da fonte de resistência, antes de efetuarem o segundo retrocruzamento, repetindo esse sistema a cada ciclo.

4.3. Polimorfismo entre CM334 e variedades de pimentão doce

Domesticação e posterior melhoramento a partir de poucas linhagens reduziu a variabilidade intraespecífica em *C. annuum*. A seleção intraespecífica para diferentes usos (condimento, páprica, consumo *in natura*, etc.) levou a uma redução maior da variabilidade genética dentro de cada tipo (PICKERSGILL, 1997; LEITE, 1999). Isto explica a pequena variabilidade entre as variedades domesticadas California Wonder e L-3436, com o mesmo tipo de fruto (grandes, doces e vermelhos), e a grande variabilidade existente entre estas e o acesso não domesticado Criollo de Morelos, que possui

características completamente distintas das variedades domesticadas, como porte alto, folhas estreitas, fruto pequeno e pungente, entre outras. Outros autores encontraram resultados similares. LEFEBVRE et al. (1995) obtiveram polimorfismos entre o cultivar de pimentão doce 'Yolo Wonder' e o acesso 'Perennial', de fruto pequeno e pungente, com 36,4% dos "primers" RAPD testados, enquanto LEITE (1999) obteve polimorfismos entre duas linhagens de pimentão doce de fruto grande e vermelho com apenas 7,4% dos "primers" testados. LEFEBVRE et al. (1993), utilizando marcadores RFLP, também observaram baixo nível de polimorfismo, variando de 0 a 9,8%, entre acessos e cultivares de frutos grandes e doces.

4.4. Análise de ligação

Embora tenham sido selecionados "primers" que geraram polimorfismos nítidos na triagem, muitos não puderam ser avaliados na população de mapeamento. A maioria dos polimorfismos que não segregaram na F_2 era constituída de fragmentos amplificados em CM334 (doador de pólen) e ausentes em L-3436 e nas plantas F_2 . Esses marcadores podem ser de origem citoplasmática ou podem corresponder a locos que estavam em heterozigose no parental masculino e contribuíram com o alelo recessivo para a planta F_1 que originou a população de mapeamento. Entretanto, a dificuldade de avaliação na F_2 foi o motivo mais frequente de perda de marcadores polimórficos. Assim como para outros marcadores, alguns marcadores RAPD são facilmente interpretáveis e outros mostram-se ambíguos. As possíveis causas são (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996): o "primer" não distinguir entre sítios de amplificação distintos; competição entre sítios de amplificação, resultando na interferência de certos fragmentos com a amplificação de outros; variações nas condições de amplificação, às quais marcadores menos robustos mostram-se mais sensíveis.

Marcadores RAPD apresentam comportamento dominante em sua maioria, mas em alguns casos ocorre a amplificação dos dois alelos de um loco RAPD por um mesmo primer, gerando marcadores codominantes. A porcentagem de marcadores RAPD codominantes aqui encontrados (4,6%) foi

muito próxima das relatadas em eucalipto (3%) por GRATTAPAGLIA e SEDEROFF (1994) e em *Mimulus* (4,5%) por BRADSHAW et al. (1998). Pequenas inserções ou deleções de DNA entre os dois sítios de anelamento do “primer” RAPD originam as diferenças de tamanho observadas entre os dois alelos amplificados de um loco RAPD codominante (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

A construção de mapas genéticos utilizando marcadores dominantes em populações F_2 apresenta a vantagem de permitir o aproveitamento de marcadores polimórficos amplificados em qualquer um dos pais, enquanto em um retrocruzamento os marcadores polimórficos amplificados no parental recorrente não podem ser aproveitados. Por exemplo, se fosse usada uma população de retrocruzamento com L-3436, somente os marcadores dos grupos identificados com L (amplificados em CM334 e não em L-3436) seriam aproveitados. Marcadores RAPD podem ser plenamente explorados se utilizados em populações de duplo-haplóides ou linhagens endogâmicas, onde as estimativas de frequência são obtidas com igual eficiência para marcadores dominantes e codominantes e o número de marcadores úteis é igual ao obtido em F_2 (KNAPP et al., 1995). Porém, o desenvolvimento dessas populações é muito demorado e trabalhoso quando comparado a populações F_2 . Populações F_2 , entretanto, estão entre as menos eficientes para a estimativa de frequências de recombinação entre marcadores dominantes, especialmente aqueles em fase de repulsão, o que traz também consideráveis problemas para a ordenação dos locos (KNAPP et al., 1995). Mapas válidos podem ser construídos a partir de subconjuntos de marcadores em fase de acoplamento, gerando dois mapas (KNAPP et al., 1995; BRADSHAW et al., 1998), como feito neste trabalho. Maior rigor na estimativa dos grupos, utilizando LOD mais alto e θ mais baixo, auxiliam na minimização de problemas nos mapas em acoplamento. Esses mapas serão tão mais confiáveis quanto menores forem as distâncias entre os locos (KNAPP et al., 1995). Neste trabalho, utilizou-se $LOD > 4$ e $\theta < 30$, condições pelo menos medianamente “estringentes”. As distâncias médias entre locos foram de 11,7 cM para o mapa de CM334 e 12,2 cM para o de L-3436, valores próximos dos 9 cM obtidos por LIVINGSTONE et al. (1999) e que sugerem que as estimativas de frequência

de recombinação não devem ter sido muito diferentes das que seriam obtidas em uma população de retrocruzamento.

Considerando o mapa genético de *Capsicum* de maior cobertura disponível (LIVINGSTONE et al., 1999), obteve-se aqui uma cobertura de pelo menos 40% do genoma (496,6 cM de um total de 1246 cM). Já LEFEBVRE et al. (1995), utilizando um cruzamento intraespecífico, estimaram o comprimento do genoma de *C. annuum* em 1390 cM, em relação ao qual a cobertura aqui obtida seria de 36,5%. Em cruzamentos intraespecíficos em *Capsicum*, como o realizado neste trabalho, a taxa de recombinação é mais elevada que a observada em cruzamentos interespecíficos, gerando distâncias em média 60% maiores que as estimadas nestes últimos, possivelmente em razão da baixa frequência de crossing-overs em regiões de menor homologia nos cruzamentos interespecíficos (LEFEBVRE et al., 1995). Como consequência, um maior número de marcadores é necessário para a obtenção de um mapa saturado em um cruzamento intraespecífico.

O número de pares de grupos de ligação homólogos obtido somado ao de grupos não homólogos é 14, próximo ao número haplóide de cromossomos em *Capsicum annuum* (n=12). Nove pares de grupos homólogos, do 1 ao 9, foram representados por pelo menos uma sequência “framework” com 32,4 a 76,6 cM. Os demais cinco grupos (10 a 14) tiveram os “frameworks” formados com apenas dois marcadores. Esses grupos possivelmente se juntarão a grupos maiores ou entre si com a adição de mais marcadores ao mapa. Mesmo fusões entre os grupos maiores podem ocorrer, pois grupos de ligação de 76,2 a 192,3 cM foram obtidos no mapa de LIVINGSTONE et al. (1999). Assim, embora o número de grupos de ligação supere o número de pares de cromossomos homólogos de pimentão, é possível que alguns desses cromossomos não estejam representados no mapa.

Foram encontrados “clusters” de marcadores nos grupos de ligação homólogos 3, 4, 6 e 9, com o maior deles no grupo 3, contendo 29 marcadores. Esses agrupamentos de marcadores, notadamente o do grupo 3, podem corresponder a regiões de supressão de recombinação próximas a centrômeros, como demonstrado por TANKSLEY et al. (1992) em tomate. De fato, “clusters” de marcadores nos mapas de *Capsicum* de PRINCE et al. (1993) e LIVINGSTONE et al. (1999) continham marcadores ligados a

centrômeros em tomate. Por outro lado, tais agrupamentos de marcadores podem ser consequência da baixa resolução do mapeamento, resultante do emprego de populações pequenas, como discutido por GRATTAPAGLIA e SEDEROFF (1994). Outro fator que pode contribuir para esse fato é a menor taxa de recombinação por unidade de distância física observada em pimentão, que possui duas a quatro vezes mais DNA que tomate porém aproximadamente o mesmo comprimento de mapa (LEFEBVRE et al., 1995; LIVINGSTONE et al., 1999).

4.5. Famílias transgressivas

A identificação de famílias com performances superiores a CM334 pode ser bastante útil para o melhoramento visando resistência a *P. capsici*, pois podem servir como ponto de partida para programas objetivando associar as resistências de L-3436 e CM334 em um único cultivar. A resistência dessas famílias pode ser resultado do acúmulo de alelos favoráveis em vários locos, de homozigose de alelos favoráveis em alguns desses locos, ou de uma combinação dessas duas alternativas. De qualquer forma, há grande possibilidade de que as famílias tenham diferentes combinações de alelos favoráveis e, ou, alelos favoráveis em homozigose em diferentes locos, o que sugere que o cruzamento entre famílias pode conduzir a plantas com resistência ainda maior.

4.6. Análise de QTLs

Alguns QTLs foram detectados em apenas um dos experimentos. Esses QTLs podem apresentar uma forte interação com o ambiente, mostrando-se importantes sob determinadas condições mas não em outras, ou podem estar fracamente associados à resistência. Não se pode excluir também a possibilidade de serem falsos-positivos.

Interações epistáticas entre QTLs podem ser responsáveis pela diferença entre o somatório dos efeitos individuais dos marcadores e o efeito

atribuído ao modelo de regressão múltipla. A ocorrência de interações epistáticas entre os locos envolvidos na resistência de *C. annuum* a *P. capsici* foi também sugerida por BANJA (1989), REIFSCHNEIDER et al. (1992), BARTUAL et al. (1994) e LEFEBVRE e PALLOIX (1996). Estes últimos encontraram interações epistáticas que em conjunto explicavam altas porcentagens da variância fenotípica. Estas incluíam interações entre QTLs envolvendo alelos do parental resistente e do parental suscetível, que podem ser uma das razões das diferenças observadas em cruzamentos de uma mesma fonte de resistência com diferentes parentais suscetíveis, como as relatadas neste trabalho e no de WALKER e BOSLAND (1999).

As estimativas de porcentagem da variância fenotípica explicada por cada QTL foram bem mais altas no programa MAPMAKER/QTL que as obtidas por regressão simples, e sugerem a presença de locos de grande efeito sobre a resistência. Os efeitos dos QTLs tendem a ser subestimados no método de análise de ponto utilizando regressão simples, porque são confundidos com as frequências de recombinação entre os marcadores e os QTLs (ZENG, 1994). Por outro lado, resultados de simulações (BEAVIS, 1998) e resultados experimentais (BRADSHAW et al., 1998) têm demonstrado que superestimativas dos efeitos de QTLs são obtidas na análise de intervalo com maior frequência em populações F_2 pequenas (em torno de 100 indivíduos), comumente empregadas nesse tipo de análise. Baseado em resultados de simulações, BEAVIS (1998) considera “suspeitas” as estimativas de efeitos genéticos obtidas nesses experimentos. A análise a partir de marcadores dominantes em F_2 exige ainda algumas aproximações em razão de não se conhecer o genótipo dos indivíduos com o fragmento amplificado. Portanto, deve-se avaliar com cautela os resultados aqui obtidos.

A conversão dos marcadores nas cercanias dos possíveis QTLs em marcadores codominantes poderia aumentar a precisão dos resultados, permitir o estudo do modo de ação de cada QTL, estimando os efeitos aditivos e de dominância, e confirmar se os marcadores significativos em grupos homólogos (p. ex., 2C e 2L, 3C e 3L e 11C e 11L) estão associados ao mesmo QTL. Isso poderia ser feito por meio de clonagem do fragmento amplificado e utilização deste como sonda em hibridizações, gerando assim um marcador RFLP, ou de clonagem, sequenciamento e desenho de primers, gerando

marcadores baseados em PCR que podem apresentar polimorfismo de comprimento (SCARS – “Sequence Characterized Amplified Regions”, PARAN e MICHELMORE, 1993) ou polimorfismo quanto à presença ou não de sítios de restrição na sequência amplificada (CAPS – “Cleaved Amplified Polimorphic Sequences”, KONIECZNY e AUSUBEL, 1993). Seria interessante também aumentar o número de plantas da população de mapeamento, bem como aumentar a cobertura do mapa por meio da introdução de novos marcadores, preferencialmente codominantes, pois há a possibilidade de outros locos não incluídos neste mapa influenciarem significativamente a resistência.

Uma região genômica de grande efeito sobre a resistência de CM334 a *P. capsici*, identificada pela técnica de análise de “bulks” segregantes (BSA – “Bulked Segregant Analysis”) utilizando marcadores RAPD, foi relatada por MASSOUDI e CANTRELL (1995) e PRINCE et al. (2001). A técnica de BSA (MICHELMORE et al., 1991) não permite a detecção de locos de menor efeito sobre características quantitativas, o que pode ser uma das explicações para o maior número de QTLs encontrado neste trabalho. Além disso, o progenitor “suscetível” empregado aqui (L-3436) apresentava um certo nível de resistência, especialmente visível quando inoculado sob condições menos severas, o que permitiu a identificação de QTLs em ambos os parentais, aumentando, assim, o número de regiões significativas detectadas. A comparação entre os resultados aqui obtidos e os desses autores é prejudicada pelo fato desses trabalhos aparentemente não terem ainda sido publicados na íntegra, o que nos impede de avaliar como foram feitos os seus experimentos de inoculação.

As inoculações aqui realizadas nas plantas F₃, em bandejas, foram bastante drásticas, pois utilizaram-se altas concentrações de inóculo (5x10⁴ zoósporos / mL) aplicadas a plantas cujo desenvolvimento foi prejudicado pelo número excessivo em um espaço pequeno. Adicionalmente, em bandejas, os esporângios produzidos em plantas suscetíveis podem aumentar a quantidade de inóculo disponível para as plantas vizinhas. Nessas condições, uma associação de QTLs parece ser necessária para conferir resistência. Entretanto, é possível que sob condições de inoculação menos severas, um ou mais dos QTLs aqui detectados mostrem efeito ainda mais pronunciado sobre a resistência, comportando-se como genes maiores. Plantas inoculadas

individualmente em recipientes de 500 mL, aos 44 e 57 dias após a semeadura, com suspensão de 10^4 zoósporos / mL, apresentaram menores incidências de doença que as inoculadas em bandejas em idade similar. Nessas condições, mesmo L-3436 apresentou altas porcentagens de sobrevivência, enquanto a testemunha suscetível (California Wonder) apresentou 100% de mortalidade. A análise de segregação nesse experimento é coerente com a hipótese de um gene dominante em CM334 e um gene dominante em L-3436, que poderiam corresponder a alguns dos locos detectados na análise de QTLs. A realização de um experimento de inoculação das plantas F_3 em recipientes individuais com uma suspensão a 10^4 zoósporos / mL, seguida de nova análise de QTLs, poderia elucidar essa questão. Entre os problemas operacionais associados a esse tipo de experimento e que levaram à opção por bandejas neste trabalho, incluem-se a grande demanda por espaço, a impossibilidade de se testar um número grande de plantas por família e, ou, de se utilizar mais de uma repetição por família, além da maior morosidade do processo de inoculação, que seria feita planta a planta.

Adicionalmente, uma comparação mais clara entre os resultados obtidos para CM334 por outros autores seria possivelmente conseguida realizando o mapeamento de QTLs em um cruzamento de CM334 com um progenitor suscetível, como L-3513 ou California Wonder. Entretanto, havia o interesse de associar as resistências de CM334 e L-3436, com vistas à utilização em programas de melhoramento, e por isso optou-se por trabalhar nesse cruzamento.

4.7. Seleção assistida por marcadores

As 27 plantas selecionadas com base em seus fenótipos moleculares para os grupos de ligação 2C, 11L, 4L e 10C (Quadro 18) apresentaram médias de sobrevivência 30%, 60,5% e 37,6% superiores às médias da população nos experimentos de inoculação 1, 2 e 3, respectivamente. À exceção de cinco plantas (6, 52, 95, 99, 105) com porcentagens de sobrevivência inferiores à média populacional em um dos experimentos, e de uma planta com porcentagens inferiores às médias em dois experimentos (92),

as plantas selecionadas foram superiores à média da população nos três experimentos. Estas incluíram 15 (74,4%) das 21 plantas com comportamento transgressivo (Quadro 10) e 21 (53,8%) das 39 plantas da população com sobrevivência acima da média para os três experimentos. Assim, embora o fenótipo molecular tenha permitido a seleção de plantas resistentes, muitas não foram identificadas por esse critério. Isso pode ter ocorrido em razão de eventos de recombinação entre os marcadores e os QTLs, à presença de alelos favoráveis em heterozigose em 4L e 10C ou ao efeito de outros locos não considerados na análise e, ou, não detectados neste trabalho. Em situações em que não se faz necessária a identificação de todas as plantas resistentes, bastando um certo número de plantas com alto grau de resistência para dar prosseguimento ao trabalho, como em um programa de melhoramento por retrocruzamentos, a seleção de plantas resistentes com base no fenótipo molecular poderia ser útil. Algumas plantas resistentes, entretanto, não seriam selecionadas. Outra possibilidade seria eliminar as plantas cujo fenótipo molecular sugere baixo nível de resistência (Quadros 16, 17 e 19). Neste trabalho, isto permitiria eliminar 37 % das plantas da população, com um erro de 7% (3 plantas em 42 – plantas 34, 66 e 91, Quadro 19). De qualquer forma, a utilidade desses marcadores para seleção assistida e a estabilidade desses QTLs em diferentes ambientes precisa ser confirmada em outras avaliações com populações independentes e sob diferentes condições experimentais.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Uma linhagem (L-3513) e um cultivar (California Wonder, CW) suscetíveis bem como uma linhagem parcialmente resistente (L-3436) foram utilizadas em cruzamentos com a fonte de resistência a *Phytophthora capsici* 'Criollo de Morelos 334' (CM334) para a realização de estudos sobre o controle genético da resistência. Testes com diferentes concentrações de inóculo aplicados ao solo adjacente às plantas indicaram que concentrações de no mínimo 5×10^3 zoósporos/mL são necessárias para se obter 100% de mortalidade nos parentais suscetíveis e que concentrações de 10^4 e 5×10^4 zoósporos/mL produzem resultados mais rápidos sem comprometer a resistência de CM334. Observou-se um gradiente de suscetibilidade tanto em inoculações via solo como naquelas por atomização da parte aérea, com L-3513 mostrando-se o mais suscetível entre os parentais, seguido de CW e L-3436, nessa ordem, tendo sido confirmada a resistência de CM334 em todas as avaliações.

A constatação de um gradiente de suscetibilidade permitiu avaliar o efeito do parental recorrente sobre a performance de progênies de cruzamentos com CM334. Esse efeito foi evidente nos híbridos F_1 , gerações F_2 e retrocruzamentos, que apresentaram menores incidências de doença no cruzamento entre CM334 e L-3436, seguidos daqueles originados do cruzamento de CM334 com CW e registrando as maiores incidências para as progênies do cruzamento entre CM334 e L-3513, de acordo com a ordem de suscetibilidade estabelecida previamente. Assim, o nível de resistência do parental recorrente parece ser de grande importância para a expressão da resistência.

Os resultados obtidos em experimentos de inoculação em bandejas com alta densidade de plantas das gerações F₁, F₂ e retrocruzamentos originadas dos cruzamentos entre CM334 e os três outros parentais não foram explicados por nenhum dos modelos de herança previamente propostos para CM334. Nessas condições, observou-se influência da idade de inoculação das plantas, com menores incidências de doença sendo registradas em inoculações realizadas em plantas mais velhas. Em plantas do cruzamento entre CM334 e L-3436 com idade superior a 44 dias e inoculadas individualmente em copos plásticos de 500 mL foi possível estabelecer um modelo simples para a herança da resistência, com dois genes dominantes independentes, cada um herdado de um dos parentais. A resistência de L-3436, de pouco efeito nos experimentos em bandejas, foi efetiva (84% de sobrevivência) neste experimento. Esses resultados demonstram que as condições de inoculação têm grande influência sobre os resultados em estudos da genética da resistência a *P. capsici*. Seria interessante avaliar se, nas condições deste experimento, a resistência de CM334 também seria herdada como uma característica monogênica nos cruzamentos com os suscetíveis L-3513 e CW.

Observou-se alto nível de polimorfismo entre CM334 e os pimentões de frutos grandes e doces L-3436 e CW (55% dos “primers” RAPD testados) e pouco polimorfismo entre estes últimos (9% dos “primers”), possivelmente por serem variedades melhoradas com várias características comuns, enquanto o primeiro é um acesso praticamente não-domesticado. Cento e setenta e quatro marcadores RAPD polimórficos amplificados por 103 “primers”, incluindo oito marcadores codominantes, foram utilizados para a análise de ligação em uma população de 114 plantas F₂ do cruzamento entre L-3436 e CM334. Os marcadores foram divididos em dois conjuntos e originaram dois mapas (C e L), contendo cada um apenas marcadores em fase de acoplamento. As análises foram realizadas no programa MAPMAKER/EXP 3.0, com LOD mínimo de 4 e frequência de recombinação máxima (θ) igual a 0,3 para a formação dos grupos e LOD mínimo de 2,0 para a ordenação dos locos “framework”. Foram obtidos 12 grupos de ligação para o conjunto C e 14 grupos para o conjunto L, cobrindo pelo menos 497 cM.

Avaliações de resistência no colo e raízes foram realizadas com as 114 famílias F₃ colhidas nas plantas da população de mapeamento, em três

experimentos independentes. Estas apresentaram distribuições aproximadamente contínuas de valores de porcentagem de sobrevivência, que não se desviaram significativamente da distribuição normal. Detectaram-se famílias transgressivas com porcentagens de sobrevivência superiores às observadas em CM334. Regiões significativamente associadas à resistência foram detectadas em pelo menos dois experimentos nos grupos de ligação 2C e 2L, 4L, 10C, 11C e 11L, explicando individualmente de 9,4 a 24% da variância fenotípica de acordo com a análise de regressão linear simples ou de 9,2 a 65,4% de acordo com o mapeamento de intervalo no programa MAPMAKER/QTL 1.1. Outras quatro regiões foram significativas em apenas um dos experimentos. Detectaram-se QTLs originários de CM334 e de L-3436, confirmando a contribuição de ambos os parentais para a resistência, como sugeriam os resultados dos experimentos anteriores. Várias plantas resistentes da população de mapeamento, mas não todas, puderam ser selecionadas com base nos fenótipos moleculares dos marcadores significativos nos grupos 2C, 11L, 4L e 10C, mas a utilidade desses marcadores para esse fim precisa ser confirmada em populações independentes e sob diferentes condições de ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, T.P., BOSLAND, P.W. An inexpensive disease screening technique for foliar blight of chile pepper seedlings. **HortScience**, Alexandria-VA, v.29, n.10, p.1182-1183, 1994.
- AMARAL, J.F. Requeima do pimentão. **O Biológico**, Campinas, v.18, n.5, p.160-161, 1952.
- ANSANI, C.V., MATSUOKA, K. Efeito da densidade de zoósporos e idade de mudas de pimentão (*Capsicum annuum*) na infectividade de *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8, n.2, p.263-268, 1983.
- BANJA, W.H. **Reação e herança da resistência a *Phytophthora capsici* Leonian em *Capsicum* sp.** Piracicaba: ESALQ-USP, 1989. 60p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1989.
- BARKSDALE, T.H., PAPAVIDAS, G.S., JOHNSTON, S.A. Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora capsici*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, n.6, p.506-509, 1984.
- BARTUAL, R., LACASA, A., MARSAL, J.I., TELLO, J.C. Epistasis in the resistance of pepper to *Phytophthora* stem blight (*Phytophthora capsici* L.) and its significance in the prediction of double cross performances. **Euphytica**, Wageningen, v.72, n.1-2, p.149-152, 1994.
- BASTEN, C.J., WEIR, B.S., ZENG, Z.B. **QTL Cartographer version 1.13**. Raleigh: Department of Statistics - North Carolina State University, 1999. 132p.
- BEAVIS, W.D. QTL analyses: Power, precision and accuracy. In: PATERSON, A.H. **Molecular dissection of complex traits**. Boca Raton: CRC, 1998. p.145-162.

- BRADSHAW, H.D. Jr, OTTO, K.G., FREWEN, B.E., MCKAY, J., SCHEMSKE, D.W. Quantitative trait loci affecting differences in floral morphology between two species of monkeyflower (*Mimulus*). **Genetics**, Baltimore, v.149, n.1, p.367-382, 1998.
- DJIAN-CAPORALINO, C., PIJAROWSKI, L., JANUEL, A., LEFEBVRE, V., DAUBÉZE, A., PALLOIX, A., DALMASSO, A., ABAD, P. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.99, n.3-4, p.496-502, 1999.
- FAO PRODUCTION YEARBOOK, v.49, p.137-138, 1997.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília : EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p.
- FRY, W.E., GOODWIN, S.B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, n.12, p.1349-1357, 1997.
- FULTON, T., CHUNWONGSE, J., TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, New Brunswick, v.13, n.3, p.207-209, 1995.
- GIL ORTEGA, R., PALAZÓN ESPAÑOL, C., CUARTERO ZUECO, J. Response of pepper to the intravarietal selection for resistance to *Phytophthora capsici*. In: EUCARPIA MEETING ON CAPSICUM AND EGGPLANT, 6, 1986, Zaragoza, Espanha. **Proceedings ...**, Zaragoza: SIA – DGA, 1986. p.141-144.
- GIL ORTEGA, R., PALAZÓN ESPAÑOL, C., CUARTERO ZUECO, J. Genética de la resistencia a *Phytophthora capsici* en dos líneas de pimiento. **Actas de Horticultura**, v.2, p.223-228, 1990a.
- GIL ORTEGA, R., PALAZÓN ESPAÑOL, C., CUARTERO ZUECO, J. Genetics of the resistance to *Phytophthora capsici* in the Mexican pepper line 'Line 29'. **OEPP/EPPA Bulletin**, v.20, n.1, p.117-122, 1990b.
- GIL ORTEGA, R., PALAZÓN ESPAÑOL, C., CUARTERO ZUECO, J. Genetics of the resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM334'. **Plant Breeding**, Berlin, v.107, n.1, p.50-55, 1991.
- GIL ORTEGA, R., PALAZÓN ESPAÑOL, C., CUARTERO ZUECO, J. Genetic relationships among four pepper genotypes resistant to *Phytophthora capsici*. **Plant Breeding**, Berlin, v.108, n.1, p.118-125, 1992.
- GIL ORTEGA, R., PALAZÓN ESPAÑOL, C., CUARTERO ZUECO, J. Interactions in the pepper - *Phytophthora capsici* system. **Plant Breeding**, Berlin, v.114, n.1, p.74-77, 1995.

- GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Baltimore, v.137, n.3, p.1121-1137, 1994.
- GUERRERO-MORENO, A., LABORDE, J.A. Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. In: EUCARPIA MEETING ON GENETICS AN BREEDING OF CAPSICUM, 4, 1980, Wageningen, Holanda. **Proceedings ...**, Wageningen: IVT, 1980. p.52-56.
- KIM, Y.J., HWANG, B.K., PARK, K.W. Expression of age-related resistance in plants infected with *Phytophthora capsici*. **Plant disease**, Saint Paul, v.73, n.9, p.745-747, 1989.
- KIMBLE, K.A., GROGAN, R.G. Resistance to *Phytophthora* root rot in pepper. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v.44, n.11, p. 872-873, 1960.
- KNAPP, S.J., HOLLOWAY, J.L., BRIDGES, W.C., LIU, B.H. Mapping dominant markers using F₂ matings. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.91, n.1, p.74-81, 1995.
- KOBORI, R.F. **Controle da murcha de fitóftora (*Phytophthora capsici*) em pimentão (*Capsicum annuum* L.) através da enxertia**. Botucatu-SP: UNESP, 1999. 138p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu, 1999.
- KOBORI, R.F., DELLA VECHIA, P.T., KUROZAWA, C., SOLER, J.M.P. Avaliação da resistência de linhagens de *Capsicum annuum* quando inoculadas com três concentrações de inóculo de *Phytophthora capsici*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.77-81, 2000.
- KONIECZNY, A., AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. **Plant Journal**, Oxford, v.4, n.2, p.403-410, 1993.
- KUROZAWA, C., PAVAN, M.A. Doenças das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p. 665-675.
- 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.
- LAMOUR, K.H., HAUSBECK, M.K. Mefenoxan insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.4, p.396-400, 2000.
- LANDER, E.S., BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Baltimore, v.121, n.1, p.185-199, 1989.

- LEFEBVRE, V., PALLOIX, A. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper - *Phytophthora capsici* Leonian. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n.4, p.503-511, 1996.
- LEFEBVRE, V., PALLOIX, A., RIVES, M. Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). **Euphytica**, Wageningen, v.71, n.3, p.189-199, 1993.
- LEFEBVRE, V., PALLOIX, A., CARANTA, C., POCHARD, E. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and double-haploid progenies. **Genome**, Ottawa, v.38, n.1, p.112-121, 1995.
- LEITE, R.S.V. **Mapeamento das regiões genômicas que conferem resistência a queima, causada por *Phytophthora capsici*, na linhagem de pimentão L-3436.** Viçosa-MG: UFV, 1999. 44p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- LEONIAN, L.H. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. **Phytopathology**, Saint Paul, v.12, n.4, p.401-408, 1922.
- LINCOLN, S., DALY, M., LANDER, E. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0**. 3.ed. Cambridge: Whitehead Institute, 1992a. 98p.
- LINCOLN, S., DALY, M., LANDER, E. **Mapping genes controlling quantitative traits with MAPMAKER/QTL 1.1**. 2.ed. Cambridge: Whitehead Institute, 1992b. 73p.
- LIVINGSTONE, K.D., LACKNEY, V.K., BLAETH, J.R., WIJK, R., JAHN, M.K. Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. **Genetics**, Baltimore, v. 152, n.3, p. 1183-1202, 1999.
- MALUF, W.R. Resistência a nematóides de galhas *Meloidogyne* spp. em espécies olerícolas. In: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R. (Ed.) **Resistência de plantas a doenças - palestras do XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Brasília:Fitopatologia Brasileira, 1997. p.57-63.
- MASSOUDI, M., CANTRELL, R. Genetic mapping of pepper, *Capsicum annuum* L., and identification of markers linked to *Phytophthora* root rot resistance (*Phytophthora capsici*). In: PLANT GENOME, 4, 1996, San Diego, CA, EUA. **Proceedings ...**, San Diego: USDA/ISPB, 1996. p. 218.
- MATHIS, W.L., WILLIAMS-WOODWARD, J., CSINOS, A.S. Insensitivity of *Phytophthora capsici* to mefenoxan in Georgia. **Phytopathology**, Saint Paul, v.89, n.6, p.S49, 1999.
- MATSUOKA, K. Melhoramento do pimentão e pimenta visando a resistência a doenças fúngicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.10, n.113, p.49-52, 1984.

- MATSUOKA, K., CASALI, V.W.D., SARAIVA, T.R.C.B. Fontes de resistência a *Phytophthora capsici* em *Capsicum annuum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.2, p.193-201, 1984.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.88, n.21, p.9828-9832, 1991.
- MITCHELL, D.J., KANNWISCHER-MITCHELL, M.E. Phytophthora. In: SINGLETON, L.L., MIHAIL, J.D., RUSH, C.M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. Saint Paul-Minnesota: APS, 1992. p.31-38.
- NAGAI, H. Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum*) visando resistência ao vírus Y. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.1, n.1, p.3-9, 1983.
- NELSON, C. **QGENE: Macintosh software for DNA-marker-based genetic analysis version 2.26**. Ithaca, NY: Cornell University, 1994. 48p.
- NELSON, C. QGENE: Software for marker-based genomic analysis and breeding. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.3, n.3, p.239-245, 1997.
- PALLOIX, A., DAUBEZE, A.M., POCHARD, E. *Phytophthora* root rot of pepper. Influence of host genotype and pathogen strain on the inoculum density – disease severity relationships. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.123, n.1, p.25-33, 1988.
- PALLOIX, A., DAUBÈZE, A.M., PHALY, T., POCHARD, E. Breeding transgressive lines of pepper for resistance to *Phytophthora capsici* in a recurrent selection system. **Euphytica**, Wageningen, v.51, n.1, p.141-150, 1990.
- PARAN, I., MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, n.8, p.985-993, 1993.
- PARRA, G., RISTAINO, J. Insensitivity to Ridomil Gold (mefenoxan) found among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight on bell pepper in North Carolina and New Jersey. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, n.6, p.711, 1998.
- PENNISI, A.M., AGOSTEO, G.E., CACCIOLA, S.O., PANE, A., FAEDDA, R. Insensitivity to metalaxyl among isolates of *Phytophthora capsici* causing root and crown rot of pepper in southern Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, n.11, p.1283, 1998.
- PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, Wageningen, v.96, n.1, p.129-133, 1997.
- PRINCE, J.P., POCHARD, E., TANKSLEY, S.D. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. **Genome**, Ottawa, v.36, n.3, p.404-417, 1993.

PRINCE, J.P., SCOTT, P.E., SIDHU, G., MYERS, P.A. Genetic resistance in pepper to *Phytophthora capsici*: scar markers and host-pathogen interactions. In: PLANT & ANIMAL GENOME, 9, 2001, San Diego, CA, EUA. **Proceedings...**, San Diego: USDA/ISPBM, 2001. Disponível em: <http://www.intl-pag.org/pag/9/abstracts/P5g_14.html>. Acesso em: 08 jan. 2001.

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

REIFSCHEIDER, F.J.B., CAFÉ-FILHO, A.C., REGO, A.M. Factors affecting expression of resistance in pepper (*Capsicum annuum*) to blight caused by *Phytophthora capsici* in screening trials. **Plant Pathology**, Oxford, v.35, n.4, p.451-456, 1986.

REIFSCHEIDER, F.J.B., BOITEUX, L.S., DELLA VECCHIA, P.T., POULOS, J.M., KURODA, N. Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. **Euphytica**, Wageningen, v. 62, n.1, p.45-49, 1992.

RISTAINO, J.B., JOHNSTON, S.A. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. **Plant Disease**, Saint Paul, v.83, n.12, p.1080-1089, 1999.

SARAIVA, T.R.C.B. **Herança da resistência à murcha do pimentão (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici* Leonian**. Viçosa-MG: UFV, 1982. 40p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1982.

SMITH, P.G., KIMBLE, K.A., GROGAN, R.G. Inheritance of resistance in peppers to *Phytophthora* root rot. **Phytopathology**, Saint Paul, v.57, n.4, p.377-379, 1967.

TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W., PRINCE, J.P., VICENTE, M.C., BONIERBALE, M.W., BROUN, P., FULTON, T.M., GIOVANNONI, J.J., GRANDILLO, S., MARTIN, G.B., MESSENGER, R., MILLER, J.C., MILLER, L., PATERSON, A.H., PINEDA, O., RODER, M.S., WING, R.A., WU, W., YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Baltimore, v. 132, n.4, p.1141-1160, 1992.

URBEN, A.F. ***Phytophthora capsici* Leonian, agente etiológico da murcha de *Capsicum annuum* L. em Minas Gerais**. Viçosa-MG:UFV, 1980. 63p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1980.

- WALKER, S.J., BOSLAND, P.W. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria-VA, v. 124, n. 1, p. 14-18, 1999.
- WANG, G.L., MACKILL, D.J., BONMAN, M., MCCOUCH, S.R., CHAMPOUX, M.C., NELSON, R.J. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. **Genetics**, Baltimore, v.136, n.4, p.1421-1434, 1994.
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKY, L.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v.136, n.4, p.1457-1468, 1994.