

LÚCIO MAURO DA SILVA GUIMARÃES

**INTROGRESSÃO DE RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS NO TOMATEIRO
CULTIVADO POR MEIO DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

LÚCIO MAURO DA SILVA GUIMARÃES

**INTROGRESSÃO DE RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS NO TOMATEIRO
CULTIVADO POR MEIO DE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de janeiro de 2002.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Conselheiro)

Prof. Acelino Couto Alfenas

Prof. Carlos Roberto Carvalho

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais José e Maria.

Aos meus irmãos Cláudia, Eliana e Analdo.

À Ana Raquel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar o curso.

À minha família, pelo amor e apoio incondicionais.

À Ana Raquel, pelo companheirismo, pelo seu amor e por estar sempre presente em minha vida.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela orientação, pelos incentivos, pelas oportunidades oferecidas e pelo convívio durante esses anos.

Aos professores Acelino Couto Alfenas, Wagner Campos Otoni Eduardo Mizubuti e Carlos Roberto Carvalho, pelo convívio enriquecedor e pelas sugestões sempre construtivas.

Aos meus amigos de laboratório, especialmente a André, Danival Freitas, David Junghans, Diogo, Edgar, Edgard Picoli, Eduardo, Edval, Elene Yamazaki, Gaus Silvestre, Iraildes, Júlio Cezar, Luiz Arthur, Luis Carlos, Marcelo Laia, Márcia Brandão, Márcio, Miguel Angel, Mina, Renildo, Rivaldave e Rodrigo Serpa, pelo companheirismo, espírito de equipe e pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

À Adriana Cheavegatti, pela amizade e pela ajuda constante.

A Douglas, pela amizade, pelo apoio e pela ajuda fundamental no laboratório e na casa de vegetação.

Aos meus amigos Rogério, Victor e Ricardo e demais colegas do curso, pela amizade e por todos os momentos compartilhados.

A todos os amigos e familiares não citados pelo nome, mas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
CAPÍTULO 1	
OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS E POPULAÇÕES DE RETROCRUZAMENTO NO GÊNERO <i>Lycopersicon</i> POR MEIO DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTE IMATURA.....	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. Material vegetal.....	15
2.2. Procedimento na polinização.....	15
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> de sementes imaturas	16
2.4. Caracterização das plantas híbridas	17
2.4.1. Caracterização morfológica e molecular	17
2.4.2. Avaliação das plantas híbridas quanto à resistência a tospovírus.....	18
2.5. Produção de populações de retrocruzamento	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Produção de híbridos interespecíficos entre <i>L. esculentum</i> e acessos do “complexo <i>peruvianum</i> ” através do cultivo <i>in vitro</i> de sementes imaturas.....	21
3.2. Caracterização das plantas híbridas	24
3.2.1. Caracterização morfológica e molecular.....	24

3.2.2. Avaliação da resistência dos híbridos interespecíficos a diferentes espécies de tospovírus.....	26
3.3. produção de populações de retrocruzamento	28
4. DISCUSSÃO	32
CAPÍTULO 2	
HERANÇA DA RESISTÊNCIA DO ACESSO LA 371-20 DE <i>L. peruvianum</i> A TOSPOVÍRUS	38
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1. Material vegetal e estudos da herança da resistência	42
2.2. Análise de co-segregação com o marcador CAPS COS134FR	43
3. RESULTADOS	45
3.1. Herança da resistência do acesso LA 371-20 (<i>L. peruvianum</i>)	45
4. DISCUSSÃO	49
3. CONCLUSÃO GERAL	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

GUIMARÃES, Lúcio Mauro da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2002. **Introgessão de resistência a tospovírus no tomateiro cultivado por meio de cruzamentos interespecíficos.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Plantas dos acessos de *Lycopersicon peruvianum* (LA 444/1-19, LA 371-20, PI 126444-3, PI 126928-2, PI 126944-6 e PI 126944-12) e de *L. chilense* (LA 130-5 e LA 2753-11) que possuem resistência de amplo espectro a tospovírus foram utilizadas no cruzamento com a cultivar MoneyMaker (*L. esculentum*) para produção de híbridos interespecíficos, visando a introgessão dessa resistência no tomateiro cultivado. Para superar as barreiras interespecíficas verificadas nestes cruzamentos utilizou-se o cultivo *in vitro* de sementes imaturas em meio de cultura Murashige & Skoog (MS). Obtiveram-se cinco híbridos do cruzamento *L. esculentum* x LA 130-5, quatro do cruzamento *L. esculentum* x LA 2753-11, quatro do cruzamento *L. esculentum* x LA 371-20, cinco do cruzamento *L. esculentum* x LA 444/1-19, um do cruzamento *L. esculentum* x PI 126944-6 e um do cruzamento *L. esculentum* x PI 126944-12. Não se obteve nenhuma planta dos cruzamentos entre *L. esculentum* e os acessos PI 126444 e PI 126928, mesmo utilizando-se o cultivo *in vitro* de semente imatura. Todos os híbridos foram

auto-incompatíveis e apresentaram características morfológicas intermediárias aos seus progenitores. A natureza híbrida das plantas F_1 foi confirmada utilizando-se um marcador molecular CAPS. Alguns dos híbridos foram propagados mediante o processo de estaquia e inoculados para avaliação da resistência com isolados de tospovírus, pertencentes às espécies *Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Groundnut ringspot virus* – GRSV e *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV. Os híbridos foram submetidos a duas inoculações via extrato foliar tamponado, realizadas num intervalo de sete dias. Apenas os híbridos do cruzamento *L. esculentum* x LA 371-20 e *L. esculentum* x PI 126944-6 foram resistentes aos três isolados utilizados. Os demais híbridos foram resistentes aos isolados das espécies GRSV e TCSV, mas suscetíveis ao isolado da espécie TSWV. Os híbridos foram retrocruzados com a cultivar MoneyMaker para obtenção de populações de retrocruzamento (RC). Populações RC_1 para os híbridos *L. esculentum* x LA 130-5, *L. esculentum* x LA 2753-11, *L. esculentum* x LA 371-20 e *L. esculentum* x LA 444/1-19 foram obtidas utilizando-se também o cultivo *in vitro* de sementes imaturas, obtendo-se um total de 99 plantas RC_1 . Estas plantas foram autofecundadas e novamente retrocruzadas com a cultivar MoneyMaker, gerando populações RC_1F_2 e RC_2 , respectivamente. O estudo da herança da resistência em uma população RC_1F_2 derivada de *L. peruvianum* LA 371-20 indicou que a resistência originária dessa fonte é condicionada por um gene dominante, sendo efetiva contra três espécies de tospovírus (TSWV, TCSV e GRSV). A análise genética dessa progênie com um marcador molecular CAPS ligado ao gene *Sw-5* demonstrou que o gene de resistência derivado do acesso LA 371-20 é um alelo do loco *Sw-5* ou um gene proximamente ligado.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Lúcio Mauro of Silva, M. S., Universidade Federal de Viçosa, January 2002. **Introgression of tospovirus resistance in cultivated tomatoes through interspecific crosses.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee members: Wagner Campos Otoni and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Accessions of *Lycopersicon peruvianum* (LA 444/1-19, LA 371-20, PI 126444-3, PI 126928-2, PI 126944-6, PI 126944-12) and *L. chilense* (LA 130-5, LA 2753-11) that possess wide spectrum tospovirus resistance were used in crosses with the cultivar Moneymaker (*L. esculentum*) for production of interspecific hybrids, seeking the introgression of this resistance into cultivated varieties. The interspecific barriers in these crossings were overcome by cultivating immature seeds in Murashige & Skoog medium. Hybrids were obtained from crosses 'Moneymaker' x LA 130-5; 'Moneymaker' x LA 2753-11; 'Moneymaker' x LA 371-20; 'Moneymaker' x LA 444/1-19; 'Moneymaker' x PI 126944-6 and 'Moneymaker' x PI 126944-12. Seeds derived from crosses between 'Moneymaker' and accessions PI 126444 and PI 126928 did not germinate or produced abnormal seedlings. All hybrids were self-incompatible and displayed morphological characteristics intermediate to their progenitors. The hybrid nature of the F₁ plants was also confirmed by molecular marker analysis. Cuttings from some of the hybrids were inoculated with virus isolates,

belonging to the species *Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Groundnut ringspot virus* - GRSV and *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV. Only the cuttings from 'MoneyMaker' x LA 371-20 and 'MoneyMaker' x PI 126944-6 hybrids were resistant to all isolates. The others hybrids were resistant to GRSV and TCSV, but susceptible to the TSWV isolate. The hybrids were backcrossed to 'MoneyMaker' for production of backcross populations (RC). RC₁ populations were obtained for 'MoneyMaker' x LA 130-5, 'MoneyMaker' x LA 2753-11, 'MoneyMaker' x LA 371-20 and 'MoneyMaker' x LA 444/1-19. The RC₁ plants were selfed and again backcrossed to 'MoneyMaker' to obtain RC₁F₂ and RC₂ populations, respectively. Inheritance studies of the resistance in a population RC₁F₂ derived from LA 371-20, showed that the resistance of this accession is conditioned by a dominant gene effective against three tospovirus species (TSWV, TCSV and GRSV). Genetic analysis of this progeny with a molecular CAPS marker linked to *Sw-5*, demonstrated that the gene derived from LA 371-20 is allelic to *Sw-5* or a tightly linked gene.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A maioria dos genes de resistência a doenças presentes em cultivares comerciais do tomateiro cultivado *Lycopersicon esculentum* (L.) Mill. são provenientes de espécies silvestres de *Lycopersicon*. Essas espécies são classificadas em dois complexos, dependendo da compatibilidade sexual com *L. esculentum*. As espécies que cruzam facilmente com *L. esculentum* são agrupadas no “complexo *esculentum*”, e as espécies separadas do tomate cultivado por severas barreiras de incompatibilidade compõem o “complexo *peruvianum*” (RICK, 1979). As espécies do “complexo *peruvianum*”, *L. peruvianum* (L.) Mill. e *L. chilense* Dun., são altamente variáveis e fontes promissoras de genes de resistência a doenças. Por exemplo, o gene *Sw-5*, derivado de um acesso de *L. peruvianum* e transferido para o tomate cultivado, é hoje utilizado como a principal fonte de resistência a tospovírus (STEVENS et al., 1992; ROSELLÓ et al., 1996). Uma situação semelhante pode ser descrita para o gene *Ty-1*, proveniente de *L. chilense* LA 1969 (ZAMIR et al., 1994), que confere resistência a TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), e para o gene

Tm-2a, derivado de *L. peruvianum*, que proporciona resistência ao ToMV (*Tomato mosaic virus*) (YOUNG et al., 1988).

Apesar desses sucessos, a exploração do germoplasma do “complexo *peruvianum*” tem sido limitada pelas barreiras de incompatibilidade que ocorrem antes (barreiras pré-fertilização) e após a fertilização do óvulo (HOGENBOOM, 1972a). Como consequência dessas barreiras, sementes viáveis são raramente obtidas do cruzamento entre *L. esculentum* e espécies do “complexo *peruvianum*”, desestimulando a sua exploração. Para superar essas severas barreiras de incompatibilidade, têm-se empregado cruzamentos direcionados e o cultivo *in vitro* de semente imatura (IMANISHI et al., 1985), entre outras técnicas, para recuperação de plantas híbridas e obtenção de populações de retrocruzamentos, com relativo sucesso.

O recente surgimento de isolados de tospovírus que superam a resistência conferida pelo gene *Sw-5* (LATHAM & JONES, 1998; LAU, 2001) tem estimulado a busca de novos genes de resistência nesse complexo. LIMA (2001), trabalhando com as espécies *L. peruvianum* e *L. chilense*, identificou acessos de *L. chilense* (LA 130 e LA 2753) e de *L. peruvianum* (LA 444/1, LA 371, PI 126444, PI 126928 e PI 126944) resistentes a TSWV, CSNV e TCSV. Como esses acessos ainda não foram utilizados em programas de melhoramento, não se conhece o controle genético dessa resistência e seu relacionamento com aquela proporcionada pelo gene *Sw-5*.

Este trabalho foi desenvolvido com os objetivos de obter híbridos interespecíficos e população de retrocruzamentos envolvendo esses acessos, utilizando a técnica de cultivo de sementes imaturas (capítulo 1), e de estudar a herança da resistência derivada do acesso LA 371 de *L. peruvianum* (capítulo 2).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, superado em volume de produção apenas pela batata. Na América Latina, o Brasil é o maior produtor, com uma área cultivada anualmente com cerca de 59 mil hectares de tomate para mesa e uma produção de 2,5 milhões de toneladas. Em 1997, foram cultivados 22 mil hectares de tomate para processamento industrial e colhidos 1,1 milhão de toneladas de frutos (CAMARGO FILHO & MAZZEI, 1997; GIORDANO & SILVA, 1999). A maior parte da colheita nacional destina-se à mesa, porém a produção destinada às agroindústrias vem crescendo, especialmente na região dos cerrados (FILGUEIRA, 2000).

Devido à importância econômica e social do tomateiro, fatores que afetam sua produtividade merecem grande atenção dos pesquisadores. Entre os problemas fitossanitários, as doenças viróticas do tomateiro constituem um fator limitante nesta cultura, devido principalmente à dificuldade de controle (FAJARDO et al., 2000). Diversos vírus são conhecidos como agentes causais de doenças em tomateiro (LOPES & SANTOS, 1994). Os vírus pertencentes ao gênero *Tospovirus* (família *Bunyaviridae*) podem ser considerados um dos mais importantes, causando o conjunto de sintomas conhecido como “vira-cabeça-do-tomateiro”. São comuns relatos de perdas variando de 30 a 100% da produção devido a essa doença (BOITEUX et al., 1993a; POZZER et al., 1996;

FAJARDO et al., 1997). A situação é mais grave em regiões onde predominam temperaturas e umidades elevadas, que favorecem a multiplicação e dispersão dos insetos-vetores (BOITEUX et al., 1993b; NAGATA et al., 1995). Outro fator que contribui para essas perdas é o fato de as principais cultivares de tomate para mesa ou para indústria, plantadas no Brasil, serem suscetíveis a tospovírus (BOITEUX et al., 1993b; POZZER et al., 1996; GIORDANO et al., 2000).

Os sintomas do “vira-cabeça” variam muito, dependendo da cultivar de tomate, idade em que a planta foi inoculada, da temperatura e da espécie de vírus envolvida. De modo geral, são observados bronzeamento nas folhas, arqueamento dos folíolos, necrose em hastes, pecíolos e folhas, manchas cloróticas em forma de anéis sobre hastes e folhas, nanismo e morte da planta. Os frutos verdes apresentam lesões irregulares, deprimidas e secas, e quando maduros apresentam lesões anelares concêntricas (GERMAN et al., 1992; ROSELLÓ et al., 1996; POZZER et al., 1996; LOPES et al., 2000).

Atualmente são propostas 12 espécies no gênero *Tospovirus*, das quais pelo menos quatro (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Groundnut ringspot virus* - GRSV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV e *Chrysanthemum stem necrosis virus* - CSNV) são relatadas como agentes causais do “vira-cabeça” no Brasil (NAGATA et al., 1995; POZZER et al., 1999; COLARICCIO et al., 2000). Na Argentina, as espécies TSWV, GRSV e TCSV já foram relatadas infectando o tomateiro (WILLIAMS et al., 2001). Na Europa, Austrália, África do Sul e Estados Unidos, TSWV tem sido a única espécie de tospovírus que causa problemas nessa cultura (PETERS et al., 1996).

A transmissão dos tospovírus é feita por insetos (tripes) pertencentes aos gêneros *Frankliniella*, *Thrips* e *Scirtothrips*. Até hoje estão comprovadas dez espécies desses gêneros como vetores: *Thrips tabaci*, *T. setosus*, *T. palmi*, *Frankliniella schultzei*, *F. occidentalis*, *F. fusca*, *F. tenuicornis*, *F. intonsa*, *F. bispinosa* e *Scirtothrips dorsalis* (ROSELLÓ et al., 1996; GARCIA et al., 2000). Dessas dez, pelo menos quatro ocorrem no Brasil: *F. occidentalis*, *F. schultzei*, *T. palmi* e *T. tabaci* (NAGATA et al., 1999). Entre as espécies vetoras, sabe-se que há diferenças na eficiência de transmissão em função da espécie de tospovírus envolvida (LORENÇÃO et al., 2001). De acordo com WIJKAMP et al. (1995), a eficiência de transmissão do INSV por *F. occidentalis*

é de 85%, 66% para TSWV, 28% para TCSV e 10% para GRSV; já a espécie de tripes *F. schultzei* transmite mais eficientemente TCSV (38%) do que GRSV (16%) e TSWV (14%).

Os tospovírus podem ser transmitidos via extrato foliar infectado, mas é muito instável *in vitro* (ZITTER, 1991). Não existem evidências de transmissão de tospovírus por meio das sementes (LOPES et al., 2000).

Segundo levantamento realizado por NAGATA et al. (1995), TSWV é a espécie predominante no Distrito Federal e no Paraná; TCSV, em São Paulo e Rio Grande do Sul; e GRSV, em Pernambuco e Minas Gerais. Levantamentos recentes realizados no Submédio do Vale São Francisco e no Distrito Federal confirmaram a predominância da espécie GRSV no Vale do São Francisco e de TSWV no Distrito Federal (LIMA et al., 2000). O CSNV foi relatado apenas na região Sudeste (COLARICCIO et al., 2000). Essa regionalização da ocorrência das espécies de tospovírus tem sido relacionada à predominância local das diferentes espécies de tripes (NAGATA et al., 1995; BEZERRA et al., 1999; FAJARDO et al., 2000). Estudos comparativos, envolvendo quatro espécies de tospovírus (TSWV, GRSV, TCSV e INSV) e quatro diferentes espécies de tripes (*Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei* e *F. intosa*), demonstraram a existência de especificidade na interação espécie de tospovírus – tripes-vetor (GOLBACH & PETERS, 1994).

O controle do tripes-vetor pelo uso de inseticidas é uma opção viável, uma vez que a transmissão pelo inseto é do tipo persistente. O inseto adquire o vírus no estágio larval, transmitindo-o por toda a fase adulta (FAJARDO et al., 2000). Embora o controle químico reduza as populações de tripes-vetor, não se tem controle efetivo do “vira-cabeça” em áreas com alta população do vetor, devido a migrações de tripes virulíferos de áreas adjacentes não-pulverizadas. Além disso, o controle químico dos tripes é dificultado pelo fato de, muitas vezes, esses insetos ocuparem partes da planta pouco acessíveis aos inseticidas, como os órgãos florais (LOURENÇÃO et al., 1999).

Outras medidas fitossanitárias de controle da doença e dos vetores, como erradicação de plantas daninhas, destruição de restos de cultura e isolamento da cultura, são pouco eficientes (FAJARDO et al., 2000). Um fator que dificulta o uso dessas medidas é a ampla gama de hospedeiros dos tospovírus e do tripes-vetor (LOURENÇÃO et al., 1999; LOPES et al., 2000).

Além do tomateiro, os tospovírus podem infectar pelo menos outras 1.050 espécies de plantas distribuídas em 92 famílias botânicas, incluindo muitas culturas de importância econômica, como pimentão, fumo, batata, alface, berinjela, amendoim, cebola, entre outras (GERMAN et al., 1992; POZZER et al., 1996; ROSELLÓ et al., 1996; GARCIA et al., 2000; EIRAS et al., 2001).

Diante desse cenário, o melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes para o controle da doença tem papel importante. A maioria dos pesquisadores tem concentrado seus esforços na identificação de fontes de resistência a tospovírus nas diferentes espécies de *Lycopersicon* spp. (SAMUEL et al., 1930; HOLMES, 1948; FINLAY, 1953; BOITEUX et al., 1993b; BOITEUX & GIORDANO, 1993; KUMAR et al., 1993; STEVENS et al., 1994; ROSELLÓ et al., 1999; LORENÇÃO et al., 2001). No Brasil, somente recentemente foram lançadas variedades resistentes aos tospovírus (BOITEUX et al., 1993a; GIORDANO et al., 2000).

As primeiras fontes de resistência a tospovírus foram encontradas em *L. pimpinellifolium* (Just.) Mill. (SAMUEL et al., 1930) e em *L. esculentum* (HOLMES, 1948). FINLAY (1953) determinou que a resistência encontrada nessas fontes era condicionada por quatro locos - o gene *Sw-1^a* e seu alelo *Sw-1^b*, bem como três genes recessivos (*sw-2*, *sw-3*, e *sw-4*) - e que todos esses genes proporcionavam resistência do tipo isolado-específica, o que os tornou desinteressantes para programas de melhoramento.

Mais recentemente, um novo gene de resistência a TSWV, nomeado *Sw-5*, foi identificado na cultivar Stevens (STEVENS et al., 1992); a resistência dessa cultivar é derivada de um acesso desconhecido de *L. peruvianum*. Estudos posteriores demonstraram que a resistência de 'Stevens' é também efetiva contra isolados das espécies TCSV e GRSV (BOITEUX & GIORDANO, 1993) e CSNV (BROMMONSCHENKEL et al., 2000). O *Sw-5* é o principal gene de resistência utilizado nos programas de melhoramento genético do tomateiro visando resistência a tospovírus, por proporcionar resistência contra todas as espécies de tospovírus que infectam o tomateiro, ser de fácil transferência entre variedades (gene dominante) e ter boa expressão em diferentes "backgrounds" de *L. esculentum* (POZZER et al., 1996; ROSELLÓ et al., 1999). Todavia, a resistência conferida por *Sw-5* pode ser parcialmente vencida quando uma alta

pressão de inóculo ocorre na transmissão por tripes (DÍEZ et al., 1995; ROSELLÓ et al., 1998) ou completamente suplantada por alguns isolados de TSWV (LATHAM & JONES, 1998; STEVENS et al., 1998; ROSELLÓ et al., 1999). Além disso, tem-se observado a “quebra” da resistência em variedades que possuem o gene *Sw-5* (LOURENÇÃO et al., 2001). Essa suplantação da resistência pode estar associada, além da heterozigose, à ocorrência de temperaturas elevadas e, ou, à amplitude térmica durante o dia (LAU, 2001; LOURENÇÃO et al., 2001).

ROSELLÓ et al. (1997) identificaram um outro gene derivado de *L. peruvianum*, o qual foi encontrado no acesso de PE-28 (CUARTERO et al., 1984) e introgridido na linhagem de *L. esculentum* UPV-32, sendo denominado *Sw-6* (ROSELLÓ et al., 1998). Esse gene tem como desvantagens dominância incompleta e eficiência reduzida em inoculações por tripes (ROSELLÓ et al., 1998).

Além do gene *Sw-6*, ROSELLÓ et al. (2001) identificaram um alelo do gene *Sw-5*, proveniente do acesso PE-18 de *L. peruvianum* (CUARTERO et al., 1984) e introgridido na linhagem UPV-1. Todavia, a eficiência desse gene contra outras espécies de tospovírus restritas à América do Sul (TCSV, GRSV e CSNV) ainda não foi determinada.

Provavelmente existem no gênero *Lycopersicon* outros genes que conferem resistência de amplo espectro a tospovírus (PATERSON et al., 1989; KUMAR et al., 1993; STEVENS et al., 1994; ROSELLÓ et al., 1998). LIMA (2001), trabalhando com as espécies *L. peruvianum* (L.) Mill. e *L. chilense* Dun., identificou acessos de *L. chilense* (LA 130 e LA 2753) e de *L. peruvianum* (LA 444/1, LA 371, PI 126444, PI 126928 e PI 126944) resistentes a TSWV, CSNV e TCSV. No entanto, existem poucos estudos visando esclarecer a base genética dessa resistência e sua introgressão em variedades cultivadas. Esse desinteresse é, em parte, devido às barreiras de incompatibilidade, que impedem a obtenção rotineira de híbridos entre *L. peruvianum* e *L. esculentum*, dificultando o trabalho de melhoramento (KALLOO, 1988).

As espécies do gênero *Lycopersicon* são classificadas em dois grupos de compatibilidade sexual. Espécies que cruzam com *L. esculentum* são agrupadas no “complexo *esculentum*” e espécies separadas do tomate cultivado por severas barreiras de incompatibilidade compõem o “complexo

peruvianum” (RICK, 1979). As espécies *L. peruvianum* e *L. chilense* pertencem ao “complexo *peruvianum*”, enquanto o “complexo *esculentum*” inclui as outras sete espécies do gênero: *L. esculentum* Mill., *L. pimpinelliifolium* (Jusl.) Mill., *L. cheesmanii* Riley, *L. chmielewskii* (Rick, Kesicki, Fobes e Holle), *L. parviflorum* (Rick, Kesicki, Fobes e Holle), *L. hirsutum* Humb. & Bonpl. e *L. pennellii* (Corr.) D`Arcy (RICK, 1990).

As espécies do “complexo *peruvianum*” são auto-incompatíveis e possuem estiletos longos, dificultando a autopolinização natural. Já as cultivares atuais de tomateiro cultivado (*L. esculentum*) são autocompatíveis, tipicamente autógamas, apresentando estiletos curtos protegidos pelo cone de anteras, dificultando a polinização cruzada (GIORDANO & RIBEIRO, 2000).

A hibridação das espécies pertencentes aos diferentes complexos é difícil, em razão da presença de barreiras de incompatibilidade que ocorrem antes (barreiras pré-fertilização) e após a fertilização do óvulo (HONGENBOOM, 1972a). Como consequência, sementes viáveis são raramente obtidas do cruzamento entre *L. esculentum* e espécies do “complexo *peruvianum*” (POYSA, 1990).

A barreira de pré-fertilização mais comum é a incompatibilidade unilateral ou incongruidade (HONGENBOOM, 1972a; ABDALLA & HERMSEN, 1972). Esse fenômeno foi demonstrado em várias espécies de plantas e ocorre na maioria das vezes em cruzamentos de espécies auto-incompatíveis (AI) com aquelas autocompatíveis (AC). O pólen dos tipos AC geralmente não é capaz de germinar no estigma das espécies AI, enquanto nenhuma inibição da germinação ocorre no cruzamento recíproco (HONGENBOOM, 1972a, b, 1975; ABDALLA & HERMSEN, 1972; DUVAL et al., 1993; RICK, 1986). Como, geralmente, o estigma das espécies *L. peruvianum* e *L. chilense* rejeita o pólen de *L. esculentum* (KALLOO, 1991), essa barreira pode ser facilmente superada utilizando-se a espécie *L. esculentum* como progenitor feminino nos cruzamentos com *L. peruvianum* e *L. chilense* (RICK, 1986).

As principais barreiras pós-fertilização são o abortamento do embrião e o desenvolvimento anormal desse embrião (NETTANCOURT et al., 1974; BARBANO & TOPOLESKI, 1984). Os embriões híbridos resultantes do cruzamento interespecífico entre *L. esculentum* e *L. peruvianum* geralmente abortam nos estádios iniciais de desenvolvimento, gerando sementes pouco

desenvolvidas, que são incapazes de completar o desenvolvimento (CHEN & ADACHI, 1996). O abortamento dos embriões ocorre devido à deterioração do endosperma e, ou, desenvolvimento anormal do embrião em consequência da ausência de transição do desenvolvimento heterotrófico para autotrófico (BARBANO & TOPOLESKY, 1984; POYSA, 1990). Essa degeneração do endosperma, observada no cruzamento interespecífico entre *L. esculentum* x *L. peruvianum*, inicia-se 10 dias após a fertilização, antes da diferenciação dos cotilédones (BARBANO & TOPOLESKI, 1984).

Os híbridos resultantes de cruzamentos interespecíficos entre *L. esculentum* e as espécies do “complexo *peruvianum*” na maioria dos casos apresentam auto-incompatibilidade. Os híbridos apresentam também as mesmas barreiras de incompatibilidade enfrentadas no cruzamento interespecífico, quando retrocruzados com *L. esculentum*, dificultando o processo de transferência de genes desejáveis para as variedades cultivadas (THOMAS & PRATT, 1981; BARBANO & TOPOLESKI, 1984; LEFRAÇOIS et al., 1993). Subseqüentes retrocruzamentos com o tomate cultivado não apresentam barreiras de incompatibilidade e as sementes germinam normalmente (ALEXANDER, 1963).

As barreiras pós-fertilização têm sido superadas utilizando-se de várias técnicas, como o cultivo de embrião (SMITH, 1944); a regeneração de plantas a partir de calos de embriões (THOMAS & PRATT, 1981); o cultivo *in vitro* de sementes imaturas (IMANISHI et al., 1985); a irradiação do pólen de *L. peruvianum* com raios gama (YAMAKAWA, 1971); a mistura de pólen de vários genótipos de *L. peruvianum* (MAHAESWARAN et al., 1986; PICÓ et al., 1999); a seleção de linhagens de *L. peruvianum* compatíveis com *L. esculentum* (RICK, 1983); e a seleção de linhagens de *L. esculentum* que cruzam mais facilmente com as espécies silvestres (KALLOO, 1991). Dentre as técnicas utilizadas para superar as barreiras pós-zigóticas, o cultivo de semente imatura tem sido relatado como a mais conveniente e efetiva na produção de híbridos F₁ entre *L. esculentum* e acessos do “complexo *peruvianum*” (IMANISHI, 1988; CHEN & IMANISHI, 1991; SACKS et al., 1997; DOGANLAR et al., 1997; GIORDANO & RIBEIRO, 2001). DOGANLAR et al. (1997), utilizando o cultivo de sementes imaturas, obtiveram 10 híbridos interespecíficos do cruzamento entre *L. esculentum* e dois acessos de

L. peruvianum. RIBEIRO & GIORDANO (2001) obtiveram 16 híbridos interespecíficos de 1.573 sementes plaqueadas em meio de cultura, em cruzamentos entre *L. esculentum* e acessos de *L. peruvianum*.

A técnica de cultivo de embrião consiste em retirar o embrião imaturo da semente e colocá-lo em meio de cultura, que tem a finalidade de substituir o endosperma, permitindo o desenvolvimento do embrião e a regeneração de plantas híbridas (SMITH, 1944). O cultivo *in vitro* de sementes imaturas é uma variante da cultura de embrião e consiste em colocar a semente imatura diretamente em meio de cultura, devido à dificuldade de se identificar ou remover o embrião (IMANISHI, 1988; DOGANLAR et al., 1997).

Utilizando o cultivo de sementes imaturas, podem-se obter híbridos interespecíficos entre o tomate cultivado e acessos resistentes a tospovírus de *L. peruvianum* e *L. chilense*, de modo a transferir os genes que conferem essa resistência para o tomateiro. Além disso, com a obtenção de híbridos interespecíficos tem-se acesso à grande diversidade alélica existente nas espécies silvestres *L. peruvianum* e *L. chilense*. Estas espécies não são somente isoladas reprodutivamente das espécies do “complexo *esculentum*”, mas também possuem diferentes “backgrounds” genéticos, de modo que os diferentes acessos do “complexo *peruvianum*” possuem maior diversidade alélica em relação às espécies do “complexo *esculentum*” (RICK, 1986; MILLER & TANKSLEY, 1990; SACKS et al., 1997; EGASHIRA et al., 2000), constituindo uma valiosa coleção de genes agronomicamente desejáveis, como produtividade, tolerância a estresses e qualidade de frutos, com grande potencial de serem explorados no melhoramento do tomate (RICK, 1982).

CAPÍTULO 1

OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS E POPULAÇÕES DE RETROCRUZAMENTO NO GÊNERO *LYCOPERSICON* POR MEIO DO CULTIVO *IN VITRO* DE SEMENTE IMATURA

1. INTRODUÇÃO

As espécies selvagens possuem um rico acervo de genes que conferem resistência a doenças, insetos, estresse ambiental e outras características agronômicas de grande utilidade em programas de melhoramento genético. Todavia, a utilização desse recurso genético no melhoramento vegetal tem sido limitada em decorrência de barreiras interespecíficas, que impedem, na maioria das vezes, a hibridação entre as espécies cultivadas e selvagens (RICK, 1982).

Os melhoristas do tomateiro têm recorrido freqüentemente às espécies selvagens na busca de genes que conferem resistência a doenças. Segundo HOYT (1992), o tomate é a planta cultivada que mais se beneficiou dos parentes silvestres, ressaltando que sem eles as cultivares atuais não existiriam. Entre as espécies silvestres do gênero *Lycopersicon*, *L. esculentum* var. *cerasiforme* e *L. pimpinellifolium* têm sido as mais

exploradas, em virtude de sua fácil hibridação com o tomateiro cultivado, *L. esculentum* (KALLOO, 1988). Genes que conferem resistência a *Fusarium* spp., *Stemphylium solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Corynebacterium michiganense*, *Cladosporium fulvum*, *Botrytis cinerea* e geminivírus, além de características como precocidade e altos teores de ácido ascórbico, têm sido identificados nessas espécies e introgridos em cultivares comerciais (STEVENS & RICK, 1986).

As espécies *L. peruvianum* e *L. chilense*, que compõem o “complexo *peruvianum*”, apesar de apresentarem a maior variabilidade genética no gênero *Lycopersicon* e serem excelentes fontes de genes de resistência a pragas e doenças, têm sido pouco exploradas nos programas de melhoramento (EGASHIRA et al., 2000). Isso se deve à existência de barreiras de incompatibilidade interespecíficas que dificultam a transferência de genes de interesse para o tomateiro cultivado (HONGENBOOM, 1972a; ABDALLA & HERMSEN, 1972). Um outro fator que limita a exploração dessas espécies é a freqüente associação dos genes de interesse com genes que conferem características agronomicamente indesejáveis (KALLOO, 1988).

As barreiras que limitam a hibridação de *L. esculentum* com as espécies do “complexo *peruvianum*” são observadas tanto na fase de pré-fertilização quanto na de pós-fertilização. A principal barreira pré-zigótica é a incompatibilidade unilateral, em que, geralmente, o estigma de *L. peruvianum* ou *L. chilense* rejeita o pólen de *L. esculentum* (KALLOO, 1991). Esse tipo de incompatibilidade, também denominado incongruidade unilateral, é superado utilizando-se de cruzamentos direcionados (HOGENBOOM, 1975): as espécies selvagens são utilizadas como progenitores masculinos e o tomate cultivado, como progenitor feminino.

As principais barreiras pós-fertilização são o abortamento do embrião e, ou, seu desenvolvimento anormal (BARBANO & TOPOLESKY, 1984; NETTANCOURT et al., 1974). Essas barreiras podem ser superadas com dificuldade pelo uso de diversas técnicas, como o cultivo de embrião (SMITH, 1944), o cultivo *in vitro* de sementes imaturas (IMANISHI et al., 1985), a regeneração de plantas a partir de calos de embriões (THOMAS & PRATT, 1981), a irradiação do pólen de *L. peruvianum* com raios gama (YAMAKAWA,

1971) e a mistura de pólen de vários genótipos de *L. peruvianum* (MAHAESWARAN et al., 1986; PICÓ et al., 1999).

Em razão de sua simplicidade e eficiência, o cultivo *in vitro* de sementes imaturas tem sido a técnica mais utilizada para suplantar as barreiras pós-fertilização nos cruzamentos entre *L. esculentum* e as espécies do “complexo *peruvianum*” (IMANISHI, 1988; CHEN & IMANISHI, 1991; DOGANLAR et al., 1997; RIBEIRO & GIORDANO, 2001). Por essa técnica tem sido possível introgridir no tomateiro cultivado características de interesse encontradas nas espécies silvestres *L. peruvianum* e *L. chilense*. Utilizando o cultivo de sementes imaturas, IMANISHI et al. (1996) transferiram genes responsáveis pela invertase de *L. peruvianum* para *L. esculentum* e DONGALAR et al. (1997) transferiram para *L. esculentum* novos genes de resistência ao nematóide da galha (*Meloidogyne* spp.) dos acessos PI 270443 e PI 126443 de *L. peruvianum*.

Em tomateiro, a doença provocada pelos tospovírus, conhecida como “vira-cabeça”, tem provocado perdas significativas na cultura (FAJARDO et al., 1997). O controle de tospovírus é difícil por várias razões. Medidas de controle culturais e eliminação do trips com inseticidas mostraram-se pouco eficientes. A única perspectiva plausível para um efetivo controle de tospovírus é a resistência varietal (DE ÁVILA, 1993). A linhagem Stevens, que contém o gene *Sw-5*, tem sido a principal fonte de resistência a tospovírus para programas de melhoramento do tomateiro (ROSELLÓ et al., 1998). O gene *Sw-5* foi introduzido em cultivares brasileiras de tomate industrial e de mesa (BOITEUX et al., 1993a; GIORDANO et al., 2000). Como este gene não é completamente efetivo em heterozigose e, ou, em condições de alta pressão de inóculo, existe a necessidade da introgressão de novos genes de resistência a tospovírus nas variedades cultivadas (STEVENS et al., 1994; ROSELLÓ et al., 1999; LAU, 2001). Assim, a introgressão de novos genes de resistência às espécies de tospovírus que ocorrem no Brasil é de grande importância para o controle dessa virose na cultura do tomateiro.

Resistência de amplo espectro aos tospovírus tem sido encontrada nas espécies selvagens *L. peruvianum*, *L. chilense* e *L. hirsutum*. LIMA (2001), trabalhando com as espécies do “complexo *peruvianum*”, selecionou acessos de *L. chilense* (LA 130 e LA 2753) e de *L. peruvianum* (LA 444/1, LA 371,

PI 126444, PI 126928 e PI 126944) resistentes a TSWV, CSNV e TCSV. A obtenção de híbridos interespecíficos é a primeira etapa na introgressão de novos genes de resistência a tospovírus de *L. peruvianum* e *L. chilense* no tomateiro cultivado. A hibridação interespecífica, além de proporcionar a combinação de dois conjuntos gênicos de indivíduos distintos, possibilita também a ocorrência da recombinação, que se constitui na fonte imediata de variação em nível de genótipo (PAIVA & VALOIS, 2001), tornando as progênies obtidas desses cruzamentos um valioso material no melhoramento do tomate e permitindo a introgressão de várias outras características agronômicas importantes.

Assim, os objetivos deste trabalho foram: obter híbridos interespecíficos e populações de retrocruzamentos entre *L. esculentum* e acessos das espécies *L. peruvianum* e *L. chilense* selecionados para resistência a tospovírus por LIMA (2001), utilizando a técnica de cultivo *in vitro* de sementes imaturas; e caracterizar as plantas híbridas por meio de características morfológicas, moleculares e de resistência a diferentes isolados de tospovírus.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram utilizados neste estudo *Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker, que se tem mostrado eficiente na regeneração *in vitro* (BROMMONSCHENKEL, comunicação pessoal), dois acessos de *L. chilense* (LA 130 e LA 2753) e cinco acessos de *L. peruvianum* (LA 444/1, LA 371, PI 126444, PI 126928 e PI 126944). Os acessos PI e LA foram fornecidos, respectivamente, pelo USDA Germplasm Repository (Geneva, NY, EUA) e Tomato Genetics Stock Center, Universidade de Davis (Califórnia, EUA). Para os cruzamentos com a cv. Moneymaker foram selecionadas plantas de cada acesso (LA 130-5, LA 2753-11, LA 444/1-19, LA 371-20, PI 12644-3, PI 126928-2, PI 126944-6 e PI 126944-12) que apresentaram resistência aos isolados AGR2 (TCSV), TSAL (TCSV), CV (CSNV) e BR01 (TSWV) de tospovírus (LIMA, 2001).

2.2. Procedimento na polinização

Os acessos do “complexo *peruvianum*” foram utilizados como progenitores masculinos e a cultivar Moneymaker como progenitor feminino, de maneira a superar a incompatibilidade unilateral. Três ou quatro flores por

inflorescência de *L. esculentum* foram emasculadas e polinizadas manualmente com o pólen retirado dos acessos do “complexo *peruvianum*”. A emasculação foi feita com auxílio de uma pinça, aproximadamente um a dois dias antes da antese, para evitar autofecundação. A polinização foi realizada logo após o processo de emasculação. As flores polinizadas foram identificadas e as flores não-polinizadas foram removidas, para evitar mistura com frutos resultantes de autofecundação. Como as plantas utilizadas nos cruzamentos foram mantidas em casa de vegetação, não foi necessária a proteção das flores recém-polinizadas com sacos de papel.

2.3. Cultivo *in vitro* de sementes imaturas

Os frutos obtidos dos cruzamentos foram colhidos em idades que variaram de 10 a 50 dias após a polinização (dap). Antes da extração das sementes, os frutos foram esterilizados superficialmente em álcool 70% durante três minutos, seguido por água sanitária Super Globo[®] (cloro ativo: 2,0% a 2,5%) a 20% durante quinze minutos. Em câmara de fluxo laminar, efetuou-se o corte dos frutos e a remoção das sementes, as quais foram separadas da mucilagem que as envolve mediante a abrasão desta em papel-filtro esterilizado. As sementes foram transferidas para placas de Petri (90x15 mm) contendo meio com sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 100 mg/L de mio-inositol, 0,4 mg/L de tiamina-HCl, 30 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar (DOGANLAR et al., 1997) e 0,5 mg/mL de zeatina. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As placas com as sementes foram mantidas a 25°C, sob luz fluorescente ($36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas escuro. As sementes que germinaram foram transferidas individualmente para caixas plásticas Magenta[®], contendo o meio citado anteriormente. As condições de incubação foram as mesmas descritas anteriormente. Quando as plântulas atingiram altura de 2 a 6 centímetros, suas raízes foram lavadas em água corrente, para retirar o excesso de meio de cultura, e em seguida transferidas para vasos plásticos, com capacidade de 0,5 L, contendo substrato PlantMax[®]. Esses vasos foram cobertos com saco plástico transparente e mantidos em câmara de crescimento, sob fotoperíodo

de 12 horas e temperatura de 26°C. Após duas semanas de aclimação, as plantas foram transferidas para casa de vegetação.

2.4. Caracterização das plantas híbridas

2.4.1. Caracterização morfológica e molecular

Para confirmar que as plantas obtidas via cultivo *in vitro* eram híbridas, foram feitas comparações da morfologia de folhas, frutos e flores dos híbridos com os seus progenitores e a análise molecular utilizando o marcador CAPS (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”) (KONIECZNY & AUSUBEL, 1993) COS134FR. Essa análise consistiu na amplificação da região genômica localizada a 12 Kb do loco *Sw-5*, via PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (COS134FR e COS134FRF2), clivagem dos produtos de amplificação com a enzima *DRA* I e análise dos produtos da clivagem por meio da eletroforese em géis de agarose. Esse ensaio permitiu distinguir os alelos de *L. esculentum* dos alelos de *L. chilense* e *L. peruvianum*.

Para realização do ensaio de PCR, o DNA das plantas foi extraído de acordo com o protocolo de FULTON et al. (1995) e a reação de PCR consistiu em 100-200 ng de DNA genômico, 5 µL do tampão de reação 10X, 2 µL da mistura de deoxinucleotídeos (0,01 M), 0,5 µL do oligonucleotídeo COS134FR (10 µM), 0,5 µL do oligonucleotídeo COS134FRF2 (10 µM), 1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (2 a 5 unidades/µL) e água estéril (MiliQ) suficiente para atingir volume final de 50 µL.

Utilizaram-se 35 ciclos de amplificação, cada qual constituído por uma etapa de desnaturação por um minuto a 94°C, anelamento por um minuto a 52°C e extensão por dois minutos e trinta segundos a 72°C. Após a conclusão dos 35 ciclos foi realizada uma extensão final a 72°C, por cinco minutos. Em seguida, a temperatura foi mantida a 4°C até a retirada das amostras. As reações de PCR foram realizadas no termociclador MJ Reserarch®, modelo PTC-100. A fim de confirmar a amplificação, para posterior digestão do fragmento (~800 pb), as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,4%) com tampão TBE (SAMBROOK et al., 1989), contendo 0,2 µM

de brometo de etídeo, em uma corrida sob voltagem constante de 70V, por uma hora. O DNA amplificado foi visualizado sob luz ultravioleta e as imagens foram capturadas e arquivadas em computador, utilizando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II, da Stratagene.

Após a confirmação da amplificação do DNA através da visualização do fragmento de 800 pb, 20 µL da alíquota do produto da amplificação de cada amostra foram digeridos com a enzima *Dra* I. Foram adicionados ao produto da amplificação 1 µL da enzima e 3 µL do tampão 10X. Em seguida a reação foi incubada à temperatura de 37°C, por duas horas. Os fragmentos foram novamente separados por eletroforese e a visualização foi realizada como descrito anteriormente.

2.4.2. Avaliação das plantas híbridas quanto à resistência a tospovírus

Das 20 plantas híbridas obtidas, apenas 11 foram utilizadas no ensaio de resistência a tospovírus, devido a perdas no processo de aclimação e contaminação de alguns híbridos com o vírus *Tomato mosaic virus* (ToMV), principalmente híbridos do cruzamento 'Moneymaker' x LA 444/1-19. Para a avaliação da resistência, os híbridos foram inoculados com três isolados de tospovírus (Tabela 1). Cerca de 30 dias após o plantio, os híbridos foram propagados vegetativamente, mediante estaquia, para obtenção de várias plantas clonadas de cada híbrido. Foram inoculadas seis plantas clonadas de cada híbrido com um isolado diferente, para verificar se a resistência era isolado-específica ou de amplo espectro. Plantas de *L. esculentum* cultivares Santa Clara e Moneymaker foram utilizadas como controles suscetíveis, enquanto plantas da linhagem SW99-1, que contém o gene *Sw-5*, como controle resistente (BROMMONSCHENKEL & TANKSLEY, 1997).

Isolados virais da coleção do Laboratório de Patologia Florestal & Genética da Interação Planta-Patógeno/BIOAGRO (Universidade Federal de Viçosa) caracterizados biológica (gama de hospedeiros), sorológica (DAS-ELISA) e molecularmente (clonagem do gene N), visando determinação das respectivas espécies (Tabela 1), foram multiplicados em tabaco

Tabela 1 - Procedência, hospedeiro original e espécies de tospovírus empregados nas avaliações da resistência (LAU, 2001)

Isolado	Procedência	Hospedeiro original	Espécie
V1-3	Viçosa/MG	Tomate (<i>L. esculentum</i>)	TCSV ²
AL	Arapiraca/AL	Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	TSWV ¹
CUBIO	Campos dos Goytacazes/RJ	Cubio (<i>Solanum sessiliflorum</i>)	GRSV ²

¹ Identificação da espécie de tospovírus determinada por DAS-ELISA.

² Identificação da espécie de tospovírus por DAS-ELISA e seqüenciamento do gene do nucleocapsídeo.

TSWV - *Tomato spotted wilt virus*.

GRSV - *Groundnut ringspot virus*.

TCSV - *Tomato chlorotic spot virus*.

(*Nicotiana tabacum* (L.) cultivar Havana 425). As plantas híbridas foram submetidas a duas inoculações via extrato foliar tamponado, realizadas com intervalo de sete dias, em casa de vegetação. A segunda inoculação visou reduzir a chance de ocorrência de escapes. O inóculo consistiu de folhas de 'Havana 425' sistemicamente infectadas, maceradas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 contendo 0,01 M de sulfito de sódio e 0,01% de carborundum (600 mesh). A reação das plantas foi avaliada periodicamente até 35 dias após a primeira inoculação.

Decorridos 35 dias da segunda inoculação, amostras de tecidos assintomáticas de plantas inoculadas foram utilizados como inóculo na inoculação de 'Havana 425', para determinar se as plantas estavam infectadas com o vírus, mas não apresentavam sintomas. No caso das plantas inoculadas com o isolado AL, foi feita a confirmação pelo teste sorológico DAS-ELISA, utilizando antissoros policlonais, capazes de reconhecer a proteína N (nucleocapsídeo) do TSWV, conforme recomendações do fabricante (Agdia). Após a reação enzimática, a intensidade de coloração foi medida em espectrofotômetro (405 nm) cerca de 45 minutos após a aplicação do substrato (p-nitrofenilfosfato), sendo os resultados de cada híbrido analisados pela média de três amostras independentes.

2.5. Produção de populações de retrocruzamento

Todas as plantas híbridas foram auto-incompatíveis; dessa forma, procedeu-se ao retrocruzamento destas com a cultivar Moneymaker. A polinização e o cultivo de sementes imaturas foram realizados conforme descrito para a obtenção dos híbridos (item 2.2). As plantas do retrocruzamento 1 (RC₁) foram novamente retrocruzadas com 'Moneymaker' e autofecundadas, gerando populações RC₂ e RC₁F₂.

3. RESULTADOS

3.1. Produção de híbridos interespecíficos entre *L. esculentum* e acessos do “complexo *peruvianum*” através do cultivo *in vitro* de sementes imaturas

À exceção dos cruzamentos entre ‘Moneymaker’ e as plantas PI 126444-3 e PI 126928-2, obtiveram-se, mediante o cultivo *in vitro* de sementes imaturas, plantas híbridas na maioria dos cruzamentos realizados. Das 7.943 sementes plaqueadas em meio de cultivo, 20 plantas híbridas foram obtidas, representando um percentual médio de germinação de 0,25% (Tabela 2). Esse percentual variou de 0% de germinação, quando se utilizou no cruzamento com a cultivar Moneymaker plantas dos acessos PI 126444 e PI 126928, a 3,08%, quando se utilizou a planta LA 444/1-19 (Tabela 2).

Embora as sementes plaqueadas tenham sido retiradas de frutos imaturos, com 17 a 60 dias após a polinização (dap), somente se observou germinação das sementes provenientes de frutos colhidos entre 29 e 50 dap, e sete das 20 sementes que germinaram foram provenientes de frutos colhidos aos 50 dap. Essas sementes germinaram no período de seis a 25 dias de cultivo *in vitro*.

Os cruzamentos apresentavam sementes de tamanhos e aspectos variáveis, algumas de tamanho e cor considerados normais em comparação com a espécie *L. esculentum*, porém o tegumento desta não apresentava a

Tabela 2 - Eficiência do cultivo de semente imatura na obtenção de híbridos interespecíficos entre *Lycopersicon esculentum* 'MoneyMaker' e diferentes acessos de *L. chilense* e *L. peruvianum*

PROGENITOR MASCULINO	Nº DE FRUTOS	Nº DE SEMENTES PLAQUEADAS	Nº DE SEMENTES QUE GERMINARAM	SGP ¹⁾ (%)	SGF ²⁾
<i>L. chilense</i>					
LA 130-5	34	1915	5	0,26	0,14
LA 2753-11	32	1990	4	0,20	0,12
<i>L. peruvianum</i>					
LA 371-20	28	1747	4	0,23	0,14
LA 444/1-19	3	162	5	3,08	1,66
PI 126944-6	10	603	1	0,16	0,10
PI 126944-12	3	142	1	0,71	0,33
PI 126444-3	9	434	0	0,0	0,0
PI 126928-2	15	950	0	0,0	0,0
TOTAL	134	7943	20	0,25	0,15

¹⁾SGP: número de sementes germinadas/número total de sementes plaqueadas x 100.

²⁾SGF: número de sementes germinadas/número total de frutos analisados.

pilosidade característica da espécie (Figura 1). Algumas sementes plaqueadas apresentavam coloração esbranquiçada e outras totalmente necrosadas ou com pontos de necrose, que não germinavam. A maioria das sementes, mesmo com aspecto normal, que não germinaram tornaram-se escurecidas ou formaram calos sem diferenciação. Algumas poucas sementes germinaram, formando apenas a raiz.

As sementes dos cruzamentos entre *L. esculentum* x *L. peruvianum* apresentaram tamanho muito reduzido quando comparadas como o padrão de *L. esculentum*. Já as sementes provenientes dos cruzamentos entre *L. esculentum* x *L. chilense* apresentaram maior tamanho. Essa característica

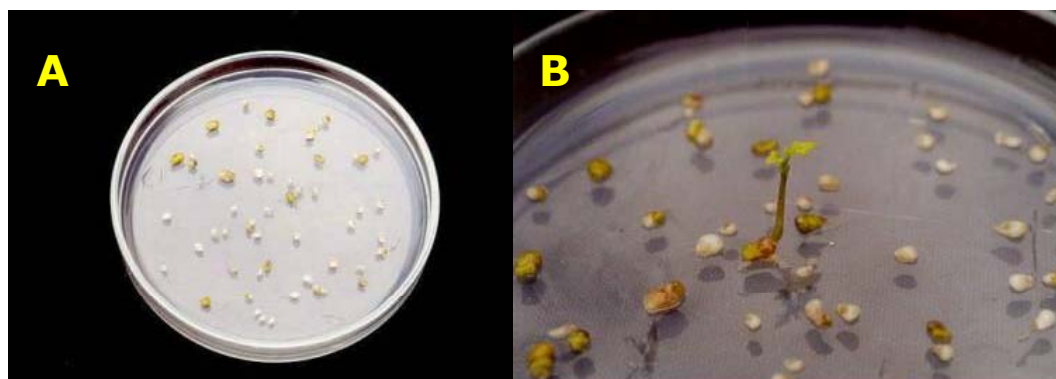


Figura 1 - Aspectos do cultivo *in vitro* de sementes imaturas. (A) Sementes imaturas, originárias do cruzamento *L. esculentum* cv. Moneymaker x *L. peruvianum* LA 371-20, cultivadas em placa de Petri contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado por DOGANLAR et al. (1997). (B) Detalhe da germinação de uma semente híbrida proveniente do cruzamento 'Moneymaker' x LA 371-20 e aspecto geral das demais sementes plaqueadas, evidenciando diferenças em tamanho e coloração e, ou, desenvolvimento incompleto.

facilitou a operação de retirada da mucilagem e plaqueamento em meio de cultura, levando a uma maior quantidade de sementes plaqueadas derivadas dos cruzamentos entre *L. esculentum* e *L. chilense* (Tabela 2). Provavelmente, esta característica esteja relacionada com uma maior compatibilidade nos cruzamentos entre *L. esculentum* e *L. chilense* em comparação a *L. esculentum* e *L. peruvianum*, uma vez que as sementes originárias das espécies *L. chilense* e *L. peruvianum* possuem tamanhos similares. Todavia, o maior tamanho das sementes não resultou em percentagens de germinação superiores.

Dentre os vários cruzamentos analisados, as sementes do cruzamento 'Moneymaker' x LA 444/1-19 foram as de maior percentual de germinação (3,08%, Tabela 2). As sementes híbridas dos cruzamentos entre 'Moneymaker' e os outros acessos apresentaram percentuais de germinação variando de 0,165 a 0,704% (Tabela 2). As sementes dos cruzamentos entre 'Moneymaker' e as plantas PI 126444-3 e PI 126928-2 necrosaram após o seu plaqueamento em meio de cultura, não germinando.

3.2. Caracterização das plantas híbridas

3.2.1. Caracterização morfológica e molecular

De modo geral, as plantas híbridas apresentaram características morfológicas intermediárias aos seus progenitores, como morfologia da folha (Figura 2) e tamanho do fruto (Figura 3). Entretanto, as flores apresentaram morfologia característica dos acessos silvestres, com o estigma projetado para fora do cone formado pelas anteras. Além disso, não houve desenvolvimento de frutos nas flores autofecundadas, comprovando que todas as plantas híbridas obtidas eram auto-incompatíveis, como os progenitores silvestres.

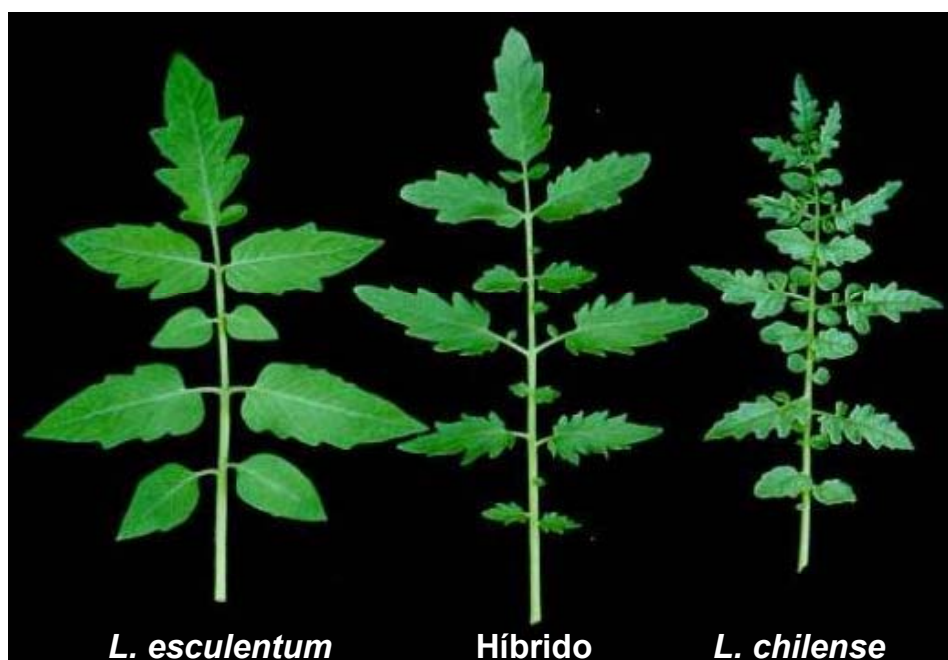


Figura 2 - Morfologia das folhas do híbrido interespecífico 'Moneymaker' x LA 130-5 e dos seus progenitores, *L. esculentum* cv. Moneymaker e *L. chilense* (LA 130-5).



Figura 3 - Características morfológicas dos frutos do híbrido interespecífico 'MoneyMaker' x LA 371-20 e dos seus progenitores, *L. esculentum* cv. MoneyMaker e *L. peruvianum* (LA 371-20). Nota-se a ocorrência de rachaduras longitudinais nos frutos maduros do híbrido.

Ao se executar a polinização cruzada entre plantas híbridas originárias de sementes diferentes, observou-se a formação de pequeno número de frutos pequenos, redondos, biloculares e de coloração amarela – diferente daquela apresentada pelos frutos dos parentais (verde-arroxeados em *L. peruvianum*, verde-claros em *L. chilense* e vermelho em *L. esculentum*) (Figura 3). No entanto, as sementes extraídas desses frutos apresentavam-se necrosadas e não germinaram quando semeadas em meio MS ou no solo. Além da coloração amarela, os frutos das plantas híbridas apresentaram tamanhos intermediários em relação aos dos progenitores e desenvolveram rachaduras concêntricas e longitudinais quando maduros.

A amplificação com os oligonucleotídeos COS134FR e COS134FRF2 e sua posterior digestão com a enzima *DraI* permitiram comprovar a natureza híbrida das plantas obtidas. Observou-se um fragmento de aproximadamente 600 pb para a cultivar MoneyMaker e um fragmento de aproximadamente 400 pb para os acessos selvagens; as plantas obtidas do cultivo *in vitro* de sementes oriundas dos diferentes cruzamentos apresentaram os dois fragmentos, descartando a possibilidade de serem originárias de autofecundação da cultivar MoneyMaker, que é autocompatível (Figura 4).

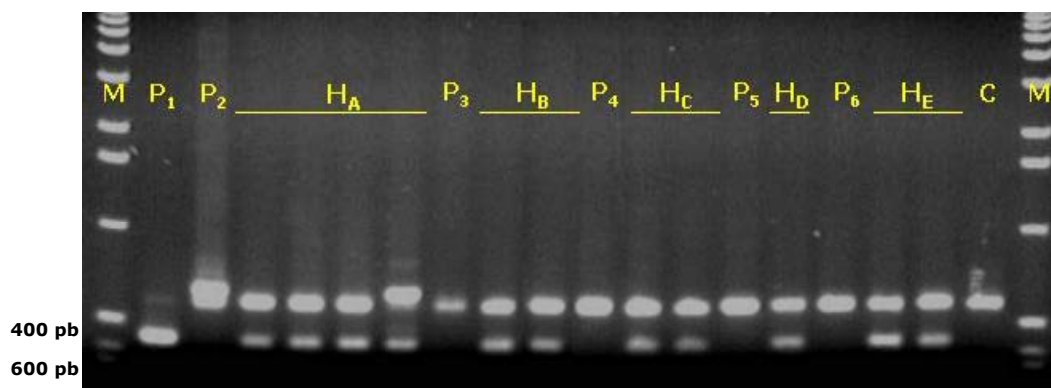


Figura 4 - Produtos da amplificação do DNA de *L. esculentum*, *L. peruvianum*, *L. chilense* e híbridos F₁ com os oligonucleotídeos COS134FR e COS134FRF2, após clivagem com a enzima de restrição *Dra*I. M: marcador kb "ladder"; P₁: cultivar Moneymaker; P₂: planta LA 130-5; H_A: híbridos 'Moneymaker' x LA 130-5; P₃: planta LA 2753-11; H_B: híbridos 'Moneymaker' x LA 2753-11; P₄: planta LA 371; H_C: híbridos 'Moneymaker' x LA 371-20; P₅: planta LA 444/1-19; H_D: híbrido 'Moneymaker' x LA 444/1-19; P₆: planta PI 126944; H_E: híbridos 'Moneymaker' x PI 126944 e C: linhagem SW99-1.

3.2.2. Avaliação da resistência dos híbridos interespecíficos a diferentes espécies de tospovírus

A resistência das plantas híbridas variou com os isolados utilizados na inoculação. Nenhuma planta híbrida apresentou sintoma local ou sistêmico quando inoculada com os isolados V1-3 e CUBIO (Tabela 3). As plantas derivadas do cruzamento entre 'Moneymaker' e LA 371-20 e PI 126944-6 foram resistentes ao isolado AL, não apresentando qualquer sintoma de infecção até 35 dias após a segunda inoculação; já as plantas híbridas provenientes dos cruzamentos entre 'Moneymaker' e as plantas LA 130-5, LA 2753-11, LA 444/1-19 e PI 126944-12 foram suscetíveis ao mesmo isolado (Tabela 3). As cultivares Santa Clara e Moneymaker (controles suscetíveis) apresentaram sintomas sistêmicos de infecção viral para todos isolados utilizados, enquanto a linhagem SW99-1, que contém o gene *Sw-5*, foi resistente.

Tabela 3 - Resistência dos híbridos interespecíficos a três espécies de tospovírus

	CÓDIGO			
		TCSV ¹⁾	GRSV ²⁾	TSWV ³⁾
<i>L. esculentum x L. chilense</i>				
MoneyMaker x LA 130-5	HEC1	0/6*	0/6	6/6
MoneyMaker x LA 130-5	HEC2	0/6	0/6	6/6
MoneyMaker x LA 130-5	HEC3	0/6	0/6	6/6
MoneyMaker x LA 130-5	HEC4	0/6	0/6	6/6
MoneyMaker x LA 2753-11	HEC5	0/6	0/6	6/6
MoneyMaker x LA 2753-11	HEC6	0/6	0/6	6/6
<i>L. esculentum x L. peruvianum</i>				
MoneyMaker x LA 371-20	HEP1	0/6	0/6	0/6
MoneyMaker x LA 371-20	HEP2	0/6	0/6	0/6
MoneyMaker x LA 444/1-19	HEP3	0/6	0/6	6/6
MoneyMaker x PI 126944-6	HEP4	0/6	0/6	0/6
MoneyMaker x PI 126944-12	HEP5	0/6	0/6	6/6
CONTROLE				
MoneyMaker		6/6	6/6	6/6
Santa Clara		6/6	6/6	6/6
SW99-1		0/6	0/6	0/6

¹ Isolado V1-3 - *Tomato chlorotic spot virus*.

² Isolado CUBIO - *Groundnut ringspot virus*.

³ Isolado AL - *Tomato spotted wilt virus*.

* número de plantas suscetíveis/número de plantas inoculadas.

O fenótipo da resistência macroscópica nos híbridos foi de aparente imunidade, ou seja, não houve nenhuma alteração nos tecidos inoculados. As plantas da linhagem SW99-1 apresentaram imunidade ou resposta de hipersensibilidade, dependendo dos isolados inoculados. Nos controles suscetíveis 'MoneyMaker' e 'Santa Clara', os sintomas de infecção viral

começaram a ser observados entre 7 e 10 dias após a inoculação. Nos clones híbridos, os sintomas apareceram entre 10 e 30 dias após a inoculação.

As plantas híbridas derivadas do cruzamento entre *L. esculentum* x *L. chilense* que foram infectadas desenvolveram sintomas necróticos na haste, nos pecíolos e na região apical (Figura 5), que culminaram, em alguns casos, em morte da planta. A necrose sempre se iniciou como pequenas lesões no limbo das folhas inoculadas; essas lesões continuaram a se expandir, atingindo as nervuras e os pecíolos. A partir dos pecíolos, a necrose atingiu as hastes, culminando com intensa necrose do ápice da planta e das brotações laterais. O híbrido HEP3 proveniente do cruzamento 'Moneymaker' x LA 444/1-19, quando inoculado com o isolado AL, desenvolveu lesões cloróticas circulares nas folhas entre 15 e 30 dias após a inoculação. Já o híbrido HEP5, derivado do cruzamento 'Moneymaker' x PI 126944-12, apresentou lesões necróticas circulares nas folhas, atingindo em alguns casos os pecíolos (Figura 5).

Os resultados obtidos visualmente pela observação dos sintomas foram confirmados para todos os isolados pelo teste biológico. Somente as plantas de tabaco inoculadas via extrato foliar tamponado dos híbridos e controles, com sintomas de infecção por vírus, apresentaram sintomas sistêmicos cerca de 4 a 10 dias após a inoculação. O teste sorológico DAS-ELISA para o isolado AL confirmou os resultados obtidos pela inspeção visual dos sintomas para este isolado.

3.3. Produção de populações de retrocruzamento

Para obtenção das populações de retrocruzamento 1 (RC₁), o uso do cultivo de semente imatura também foi eficaz. Das 5.072 sementes plaqueadas, foram obtidas 105 plantas RC₁ (Tabela 4). Comparando a germinação das sementes dos híbridos interespecíficos com a germinação das sementes das populações de retrocruzamento, através do cultivo de semente imatura, observa-se incremento no percentual de germinação média das sementes plaqueadas de 0,25% para 2,07%.

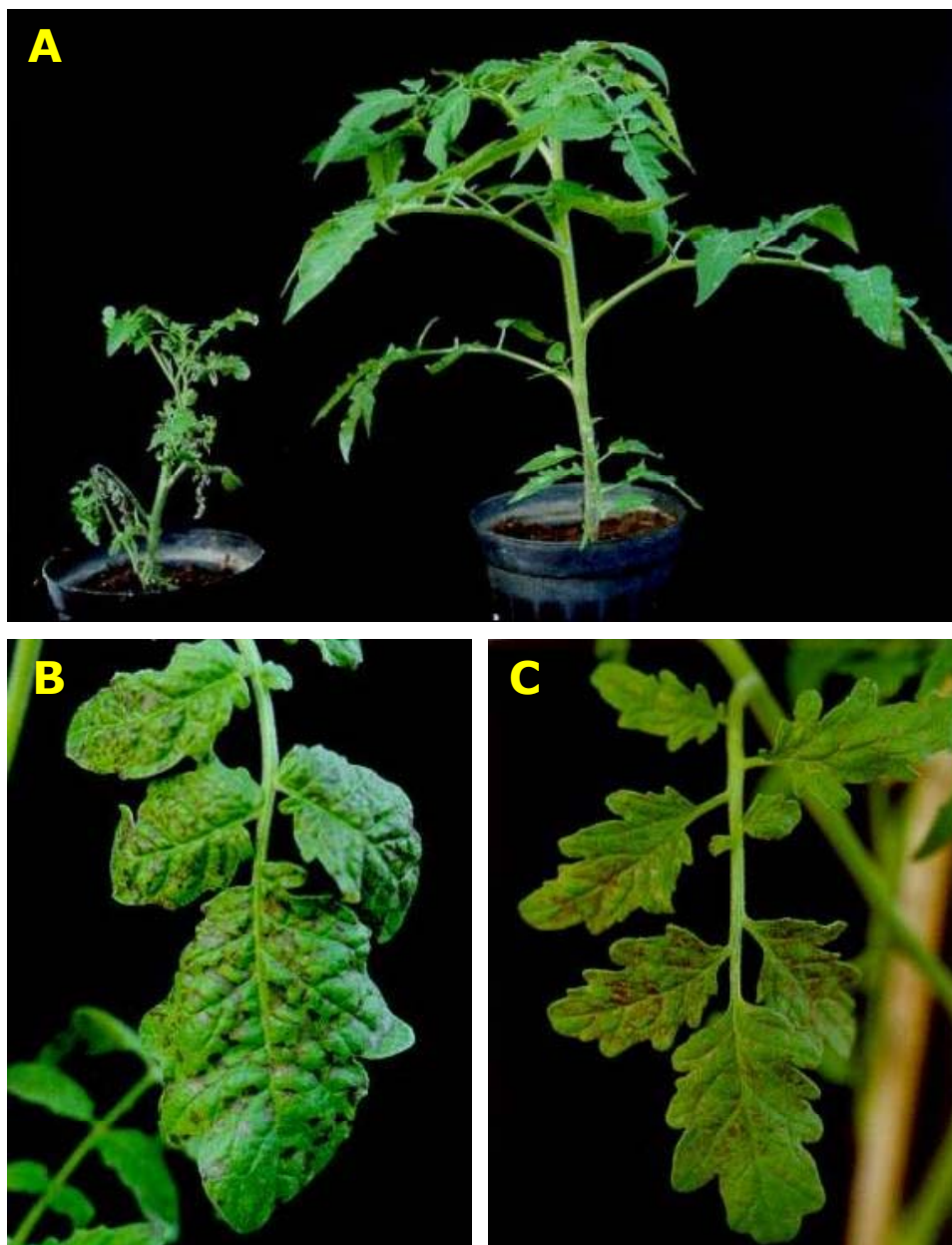


Figura 5 - Sintomas de infecção viral apresentados pelos híbridos interespecíficos ao isolado AL de TSWV - *Tomato spotted wilt virus*. (A) Híbrido HEC5 ('Moneymaker' x LA 2753-11) com infecção viral e linhagem resistente SW99-1. (B) Detalhe do sintoma de infecção viral no híbrido HEP5 ('Moneymaker' x PI 126944-12). (C) Detalhe do sintoma de infecção viral no híbrido HEC2 ('Moneymaker' x LA 130-5).

Tabela 4 - Eficiência do cultivo de semente imatura na obtenção de populações de retrocruzamento 1

Retrocruzamentos	Nº de frutos	Nº de sementes plaqueadas	Nº de sementes que germinaram	SGP ¹⁾ (%)	SGF ²⁾
MM ³⁾ x HEC1 (MM x LA 130-5)	10	514	22	4,28	2,20
MM x HEC2 (MM x LA 130-5)	19	939	17	1,81	0,89
MM x HEC3 (MM x LA 130-5)	16	679	12	1,76	0,75
MM x HEC4 (MM x LA 130-5)	15	809	5	0,62	0,20
MM x HEC5 (MM x LA 2753-11)	14	797	34	4,64	2,43
MM x HEP1 (MM x LA 371-20)	16	896	5	0,56	0,31
MM x HEP3 (MM x LA 444/1-19)	8	438	10	2,28	1,25
Total	98	5072	105	2,07	1,07

¹⁾SGP: número de sementes germinadas/número total de sementes plaqueadas x 100.

²⁾SGF: número de sementes germinadas/número total de frutos analisados.

³⁾MM: cultivar Moneymaker.

Assim, como na obtenção dos híbridos, os resultados foram bastante variáveis, dependendo dos genótipos envolvidos nos cruzamentos. Os maiores percentuais de germinação ocorreram nos retrocruzamentos entre 'Moneymaker' e híbridos interespecíficos de *L. esculentum* x *L. chilense*, com percentagem de germinação de 4,28% no retrocruzamento 'Moneymaker' x HEC1 e 4,64% no retrocruzamento 'Moneymaker' x HEC5. Já para os retrocruzamentos entre a cultivar Moneymaker e os híbridos provenientes dos cruzamentos entre *L. esculentum* x *L. peruvianum* houve pequeno aumento no percentual de germinação (de 0,23% para 0,55%) no retrocruzamento 'Moneymaker' x HEP1 e redução de 3,08% para 2,28% no retrocruzamento 'Moneymaker' x HEP3.

A quase totalidade das plantas RC₁ apresentou estilete longo, característico dos acessos selvagens. Quando se procedeu à autofecundação manual, foram obtidas sementes de 37 plantas, gerando populações RC₁F₂. Ao todo, 68 plantas foram auto-incompatíveis, não produzindo sementes, mesmo

com polinização manual. Os frutos das plantas RC₁ variaram em tamanho e cor (Figura 6). Em geral, os frutos eram de coloração laranja a vermelha, porém frutos amarelos, como os dos progenitores híbridos, ainda foram produzidos.



Figura 6 - Aspecto da morfologia dos frutos gerados a partir da autofecundação das plantas RC₁, dos cruzamentos entre “Moneymaker” x HEC1, “Moneymaker” x HEC5 e “Moneymaker” x HEP1.

A geração RC₁ mostrou grande fertilidade, não sendo necessário o cultivo de sementes imaturas para obtenção das populações RC₂.

4. DISCUSSÃO

Utilizando-se a técnica de cultivo *in vitro* de sementes imaturas, foi possível obter híbridos para a maioria dos cruzamentos entre *L. esculentum* e os acessos do “complexo *peruvianum*” utilizados neste trabalho. O valor percentual médio de germinação por número de sementes plaqueadas obtido (0,25%), embora baixo devido à incompatibilidade entre as espécies, é comparável àqueles relatados por outros pesquisadores utilizando a mesma metodologia e diferentes genótipos do tomateiro cultivado e espécies silvestres. CHEN & IMANISHI (1991) obtiveram percentual médio de germinação de 0,23% utilizando também o meio MS para a germinação de sementes imaturas de cruzamentos entre diversas variedades de *L. esculentum* e os acessos PI 128644, PI 128652 e PI 270435 do “complexo *peruvianum*”. DOGANLAR et al. (1997), usando o meio MS, acrescido de 100 mg/L de mio-inositol, 0,4 mg/L de tiamina-HCL e 30 g/L de sacarose, obtiveram percentual médio de germinação de 0,30% em cruzamentos envolvendo *L. esculentum* e *L. peruvianum*. Já IMANISHI (1991), cultivando sementes imaturas em meio MS oriundas de cruzamentos entre *L. esculentum* cv. Early Pink e acessos do “complexo *peruvianum*”, obteve percentual médio de germinação de 0,52%.

Apenas para os cruzamentos entre ‘Moneymaker’ e as plantas PI 126444-3 e PI 126928-2 não foram obtidos híbridos interespecíficos. A alta incompatibilidade no cruzamento desses acessos com ‘Moneymaker’ indica que a barreira interespecífica entre *L. esculentum* e os acessos PI 126444-3 e

PI 126928-2 de *L. peruvianum* é maior que a observada entre *L. esculentum* e os outros acessos utilizados neste estudo (LA 130-5, LA 2753-11, LA 371-20, LA444/1-19, PI 126944-6 e PI 126944-12). Possivelmente, híbridos interespecíficos provenientes dos cruzamentos entre 'Moneymaker' e os acessos PI 126444-3 e PI 126928-2 poderão ser produzidos cultivando-se maior número de sementes, utilizando a combinação de técnicas para superar as barreiras interespecíficas (PICÓ et al., 2002) ou outro progenitor feminino mais compatível com esses acessos. CHEN & IMANISHI (1991) não obtiveram híbridos interespecíficos no cruzamento entre o acesso PI 270435 de *L. peruvianum* e a cultivar Kyoryoku Toko, de um total de 4.306 sementes plaqueadas. Utilizando esse mesmo acesso em cruzamento com *L. esculentum* cv. Early Pink, os pesquisadores obtiveram 27 híbridos em 6.935 sementes plaqueadas.

Diferenças de compatibilidade em cruzamentos entre genótipos de *L. esculentum* e *L. peruvianum* têm sido observadas por outros pesquisadores (IMANISHI, 1988; CHEN & IMANISHI, 1991; RIBEIRO & GIORDANO, 2001). Essa variação na compatibilidade é determinada tanto pelo genótipo da espécie *L. esculentum* utilizado como progenitor feminino quanto pelos acessos do "complexo *peruvianum*". RIBEIRO & GIORDANO (2001), ao utilizarem o meio HLH (NEAL & TOPOLESKI, 1983), obtiveram taxa de germinação de 1,27% em cruzamentos entre a cultivar Floradade e os acessos de *L. peruvianum* (CNPB 946, CNPB 947 e CNPB 948) e de 0,55% em cruzamentos entre 'IPA-5' e os mesmos acessos de *L. peruvianum*. IMANISHI (1988) obteve germinação de 0,46% de sementes provenientes de cruzamentos entre a cultivar Kyoryoku Toko e o acesso PI 128644 de *L. peruvianum* e de 0,16% em cruzamentos entre a 'Lukulus' e o mesmo acesso. CHEN & IMANISHI (1991), ao estudarem a compatibilidade em cruzamentos entre cultivares de tomate e acessos do "complexo *peruvianum*", obtiveram percentagens médias de germinação variando de 0,76%, quando utilizaram 'Early Pink' como progenitor feminino, a 0,0%, quando utilizaram 'Giban'. Nesse mesmo estudo, obtiveram variação na percentagem média de germinação de 0,11%, quando utilizaram o acesso PI 270435 como progenitor masculino, a 0,36%, quando usaram o acesso PI 128644. Vê-se, por isso, que

a combinação dos parentais é uma etapa importante na superação das barreiras interespecíficas.

A maioria das sementes híbridas que germinaram (35%) era proveniente de frutos com 50 dap. Esses resultados diferem dos encontrados por CHEN & ADACHI (1996), que obtiveram os melhores percentuais de germinação em sementes retiradas de frutos em idades que variaram de 13 a 26 dap, com maior freqüência de germinação das sementes aos 25-26 dap. Provavelmente isso se deve às características de maturação do fruto da cultivar utilizada como progenitor feminino. DUVAL et al. (1993) verificaram que as idades de 25 e 26 dap foram mais efetivas para a obtenção de híbridos quando a cultivar Floradel foi utilizada como progenitor feminino, ao passo que com 'Santa Clara' a melhor idade foi de 34 dap.

Para a obtenção das populações de retrocruzamentos foi necessário também utilizar o cultivo *in vitro* de sementes imaturas. A obtenção dessas populações por meio dessa técnica foi relativamente mais fácil, comparativamente à obtenção dos híbridos. O incremento no percentual de germinação (0,25% para 2,07%) se deve, provavelmente, à redução na incompatibilidade entre *L. esculentum* e as espécies *L. chilense* e *L. peruvianum*, à medida que se avança o retrocruzamento e ocorre a recuperação do "background" genético de *L. esculentum*. Esse aumento no percentual de germinação ocorreu principalmente nos cruzamentos entre *L. esculentum* e os híbridos *L. esculentum* x *L. chilense* (EC) (0,23% para 2,40%). Para os cruzamentos entre *L. esculentum* e os híbridos *L. esculentum* x *L. peruvianum* (EP) esse aumento foi menor (0,27% para 1,12%). Esses resultados condizem com os encontrados por alguns pesquisadores na produção de populações de RC₁ a partir de híbridos interespecíficos de EP. IMANISHI (1988) obteve o mesmo percentual de germinação na F₁ e no RC₁. IMANISHI et al. (1996) obtiveram decréscimo no percentual de germinação de sementes por frutos de 0,34% na F₁ para 0,15% no RC₁, em cruzamentos entre 'Early Pink' e *L. peruvianum* var. *humifusum* (LA 2153); THOMAS & PRATT (1981) não obtiveram plantas RC₁ por meio do cultivo de sementes imaturas. Apesar da recuperação parcial do "background" genético de *L. esculentum*, os híbridos EP apresentam maior incompatibilidade quando retrocruzados com o tomate cultivado, em comparação com os híbridos EC.

Populações avançadas de retrocruzamento, bem como autofecundação de algumas plantas da população RC₁, foram obtidas sem a necessidade do uso da técnica de cultivo de sementes imaturas. Essas populações poderão ser utilizadas para verificar o comportamento da resistência no “background” de *L. esculentum* e no estudo da herança da resistência a tospovírus. As populações avançadas de retrocruzamentos poderão também ser avaliadas para identificar novos genes de resistência úteis no melhoramento do tomateiro. Por exemplo, o acesso PI 126944 tem sido relatado na literatura como boa fonte de resistência a geminivírus, *Fusarium* e tolerante a ToMV (PICÓ et al., 2002).

O interesse principal da obtenção dos híbridos interespecíficos neste trabalho é a introgressão de novos genes de resistência a tospovírus. LIMA (2001), trabalhando com os mesmos acessos utilizados neste trabalho, verificou resistência aos isolados AGR2 (TCSV), TSAL (TCSV), CV (CSNV) e BR01 (TSWV). Essa resistência foi comprovada também nos híbridos provenientes dos cruzamentos entre ‘Moneymaker’ e as plantas LA 371-20 e PI 126944-6 (*L. peruvianum*), além de serem resistentes contra todos os isolados inoculados (TSWV, GRSV e TCSV). Esses resultados também condizem com os encontrados na literatura, em que os acessos LA 371 e PI 126944 têm sido selecionados como boas fontes de resistência a TSWV em várias seleções de genótipos (LIMA, 2001; ROSELLÓ et al., 1999; PATERSON et al., 1989) e TCSV (LOURENÇÃO et al., 2001; LIMA, 2001). A alta resistência do acesso PI 126944 a isolados de TSWV já foi relatada por PATERSON et al. (1989), ROSELLÓ et al. (1999), PICÓ et al. (2002), entre outros. ROSELLÓ et al. (1999), testando acessos de *L. peruvianum* e *L. chilense* para resistência a dois isolados de TSWV em inoculações via extrato foliar e transmissão por tripes, apontam a PI 126944 como uma das melhores fontes de resistência. Os dados aqui apresentados demonstram que essa resistência também é efetiva contra outras espécies de tospovírus, como TCSV e GRSV. LOURENÇÃO et al. (2001), avaliando os acessos de *Lycopersicon* spp. em campo, obtiveram baixas taxas de infecção a TCSV em populações do acesso LA 371. Estudos de herança deverão ser realizados para determinar se a resistência conferida pelo acesso LA 371 é atribuída a um ou mais genes e se são ou não alélicos

aos genes descritos por FINLAY (1953), STEVENS et al. (1992) e ROSELLÓ et al. (1998).

O híbrido HEP5, proveniente do cruzamento entre 'Moneymaker' x PI 126944-12, foi resistente aos isolados V1-3 e CUBIO. No entanto, diferentemente do híbrido proveniente do cruzamento 'Moneymaker' x PI 126944-6, o híbrido HEP5 foi suscetível ao isolado AL. Isso sugere a existência de pelo menos dois genes conferindo resistência às diferentes espécies de tospovírus dentro do acesso PI 126944. Estudos adicionais serão necessários para determinar se a resistência de amplo espectro, encontrada na planta PI 126944-6, é condicionada por um ou mais genes e sua relação com a resistência isolado-específica encontrada na planta PI 126944-12 do mesmo acesso.

O híbrido derivado do cruzamento entre 'Moneymaker' x LA 444/1-19 de *L. peruvianum* foi resistente a dois (V1-3 e CUBIO) dos três isolados testados. A resistência observada no acesso LA 444/1 tem sido objeto de estudo em de casa de vegetação e em campo, porém, até o momento, nenhuma cultivar baseada nessa fonte foi desenvolvida. LIMA (2001) sugere que a resistência do acesso LA 444/1 é determinada por pelo menos dois genes dominantes e independentes. LOURENÇÃO et al. (2001), avaliando os acessos de *Lycopersicon* spp., em campo, obtiveram baixas taxas de infecção a TCSV em LA 444/1.

Apesar de menos explorada, a espécie *L. chilense* parece ser um importante reservatório de genes de resistência a tospovírus (STEVENS et al., 1994; ROSELLÓ et al., 1999). STEVENS et al. (1994) avaliaram 63 acessos de *L. chilense* contra diferentes isolados de TSWV e concluíram que os maiores níveis de resistência foram apresentados pelos acessos LA 130 e LA 2753. No presente trabalho, os híbridos obtidos do cruzamento entre 'Moneymaker' x LA 130-5 e do cruzamento 'Moneymaker' x LA 2753-11 foram resistentes aos isolados V1-3 (TCSV) e CUBIO (GRSV), mas foram suscetíveis ao isolado AL (TSWV). Esse espectro de resistência, até o momento, não havia sido descrito em *Lycopersicon* spp. e merece a confirmação por meio da inoculação com outros isolados dessas espécies. IIZUKA et al. (1993), ao selecionarem acessos de *Lycopersicon* spp. resistentes a TSWV, também encontraram resistência do tipo isolado-específica a diferentes isolados de TSWV, no acesso

LA 1967 de *L. chilense*. KUMAR et al. (1993) citam o acesso LA 2931 de *L. chilense* como resistente a TSWV em inoculações por tripes e via extrato foliar tamponado, porém o controle genético dessa resistência não foi determinado.

Os resultados iniciais de introgressão relatados neste trabalho demonstram a diversidade de resistência a tospovírus que existe no gênero *Lycopersicon*. Os híbridos e as populações de retrocruzamento obtidos permitirão estudos de herança e a introgressão dos genes em cultivares e híbridos comerciais, ampliando os recursos genéticos disponíveis para o controle das tospoviroses do tomateiro.

CAPÍTULO 2

HERANÇA DA RESISTÊNCIA DO ACESSO LA 371-20 DE *L. peruvianum* A TOSPOVÍRUS

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que afetam a produtividade do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), a doença virótica conhecida como “vira-cabeça-do-tomateiro” ocupa papel de destaque, pois causa significativas perdas na produção, refletindo em grandes prejuízos econômicos (BOITEUX et al., 1993a; POZZER et al., 1996; FAJARDO et al., 1997). Os sintomas do “vira-cabeça” variam com a cultivar de tomate, a idade em que a planta foi inoculada, a temperatura, o isolado e a espécie de vírus envolvida. De modo geral, verificam-se bronzeamento nas folhas, arqueamento dos folíolos, necrose em hastes, pecíolos e folhas, manchas cloróticas em forma de anéis sobre hastes e folhas, nanismo e morte da planta. Os frutos verdes apresentam lesões irregulares, deprimidas e secas, e, quando maduros, lesões anelares concêntricas (GERMAN et al., 1992; ROSELLÓ et al., 1996; POZZER et al., 1996; LOPES et al., 2000).

O “vira-cabeça” é causado por vírus do gênero *Tospovirus*. Os membros deste gênero possuem partículas esféricas ou quase isométricas, limitadas por um envelope lipídico contendo glicoproteínas (GERMAN et al., 1992). No interior da partícula, além da polimerase viral, estão presentes três RNAs designados pelo seu tamanho relativo: RNA L, RNA M e RNA S (DE HAAN et al., 1991). Das 12 espécies conhecidas de tospovírus, pelo menos quatro já foram relatadas infectando naturalmente o tomateiro no Brasil (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV, *Groundnut ringspot virus* - GRSV e *Chrysanthemum stem necrosis virus* – CSNV). Nos países do hemisfério norte a única espécie de tospovírus que infecta o tomateiro é o TSWV (ROSELLÓ et al., 1996; PETERS et al., 1996). O cenário na Argentina é mais parecido com o do Brasil. Das quatro espécies de tospovírus relatadas no Brasil, três (TSWV, GRSV e TCSV) já foram encontradas infectando o tomateiro na Argentina (WILLIAMS et al., 2001).

A transmissão de tospovírus é feita por tripes dos gêneros *Frankliniella*, *Thrips* e *Scirtothrips* (LOURENÇÃO et al., 2001). No Brasil, o método tradicional de controle da doença tem sido a aplicação de inseticidas visando eliminar o inseto-vetor. Considerando que esse método apresenta desvantagens, como toxicidade dos produtos utilizados, riscos de contaminação do ambiente, custo adicional, além de não ser eficiente em determinadas situações, a utilização de resistência varietal tem sido apontada como a melhor estratégia para o manejo das tospoviroses do tomateiro (LOURENÇÃO et al., 1999; LOPES et al., 2000).

A primeira fonte de resistência a TSWV foi encontrada em *L. pimpinellifolium* (SAMUEL et al., 1930; FINLAY, 1953). Essa fonte foi utilizada no desenvolvimento da cultivar Pearl Harbor (KIKUTA et al., 1945). HOLMES (1948), avaliando a resistência de cultivares de *L. esculentum*, identificou resistência a TSWV em ‘Rey de los Tempranos’ e ‘Manzana’. FINLAY (1953) estudou a herança da resistência dessas três cultivares a dez diferentes isolados de TSWV da Austrália e verificou que a resistência era determinada por quatro locos, um gene dominante ($Sw-1^a$) e seu alelo ($Sw-1^b$) e três recessivos ($sw-2$, $sw-3$ e $sw-4$), que proporcionam resistência do tipo isolado-específica.

STEVENS et al. (1992) descreveram um novo gene de resistência a TSWV, originário de *L. peruvianum*, na cultivar Stevens (STEVENS, 1964). Por proporcionar resistência efetiva contra isolados de TSWV de diferentes origens geográficas, esse gene foi designado *Sw-5*. Estudos posteriores revelaram que *Sw-5* também confere resistência a isolados de TCSV e GRSV (BOITEUX & GIORDANO, 1993) e CSNV (BROMMONSCHENKEL et al., 2000). Esse gene foi mapeado próximo à região do telômero no cromossomo 9, entre os marcadores RFLP CT71 e CT220, mais proximamente ligado ao marcador CT220 (BROMMONSCHENKEL & TANKSLEY, 1997), e recentemente clonado e caracterizado (BROMMONSCHENKEL et al., 2000). O gene *Sw-5* codifica uma proteína com 1.246 aminoácidos, que possui domínios NBS (“nucleotide binding site”) e LRR (“leucine rich repeats”) (BROMMONSCHENKEL et al., 2000). Essas características estruturais são encontradas em outras proteínas envolvidas na resposta de plantas a patógenos (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996).

O fato de *Sw-5* ser eficaz contra todas as espécies de tospovírus que infectam o tomateiro, ser de fácil transferência entre variedades (gene dominante) e mostrar boa expressão em diferentes “backgrounds” de *L. esculentum* tem determinado a sua utilização intensiva nos programas de melhoramento genético do tomateiro visando resistência a tospovírus (ROSELLÓ et al., 1999). Por exemplo, cultivares brasileiros de tomate para mesa ou industrial com esse gene, como ‘TSW-10’ (BOITEUX et al., 1993a) e ‘Viradouro’ (GIORDANO et al., 2000), respectivamente, foram liberados comercialmente. Entretanto, a existência de isolados de tospovírus capazes de suplantar parcial ou totalmente a resistência conferida por *Sw-5* levanta dúvidas sobre a durabilidade dessa resistência, enfatizando a necessidade da introgressão de novos genes de resistência a tospovírus no tomateiro cultivado (DÍEZ et al., 1995; ROSELLÓ et al., 1998; LATHAM & JONES, 1998; STEVENS et al., 1998; LAU, 2001). Essa necessidade é reforçada pelo relato da “quebra” da resistência da cultivar Viradouro em campo no Estado de São Paulo (LOURENÇÃO et al., 2001).

ROSELLÓ et al. (1998) identificaram mais um gene de resistência a TSWV na espécie silvestre *L. peruvianum*, denominado *Sw-6*. Este gene tem como desvantagens a dominância incompleta e a reduzida eficiência em

inoculações por tripses, que restringem a sua utilização em programas de melhoramento. ROSELLÓ et al. (2001) identificaram também um alelo do loco Sw-5, proveniente do acesso PE-18 de *L. peruvianum* e introgridido na linhagem UPV-1. Todavia, ainda não se determinou a eficiência desse gene contra outras espécies de tospovírus que ocorrem em tomateiro no Brasil (TCSV, GRSV e CSNV).

Resistência de amplo espectro a tospovírus tem sido encontrada nas espécies silvestres do tomateiro (KUMAR et al., 1993; STEVENS et al., 1994; ROSELLÓ et al., 1998). LIMA (2001), trabalhando com as espécies do “complexo *peruvianum*”, identificou nos acessos de *L. chilense* (LA 130 e LA 2753) e de *L. peruvianum* (LA 444/1, LA 371, PI 126444, PI 126928 e PI 126944) resistência de amplo espectro aos tospovírus TSWV, GRSV e TCSV. Utilizando a técnica de cultivo *in vitro* de sementes imaturas (capítulo 1) obtiveram-se cinco híbridos do cruzamento *L. esculentum* x LA 130-5; quatro do cruzamento *L. esculentum* x LA 2753-11; quatro do cruzamento *L. esculentum* x LA 371-20; cinco do cruzamento *L. esculentum* x LA 444/1-19; um do cruzamento *L. esculentum* x PI 126944-6; e um do cruzamento *L. esculentum* x PI 126944-12. De modo similar ao da cultivar Stevens, apenas os híbridos dos cruzamentos entre *L. esculentum* x LA 371-20 e *L. esculentum* x 126944-6 foram resistentes aos três isolados utilizados de tospovírus pertencentes às espécies TSWV, TCSV e GRSV. Os demais híbridos foram resistentes aos isolados das espécies GRSV e TCSV, mas suscetíveis ao isolado de TSWV.

Como não se conhece a herança da resistência de LA 371-20 às diferentes espécies de tospovírus e o relacionamento genético dessa resistência com aquela proporcionada pelo Sw-5, executou-se este trabalho com os seguintes objetivos: determinar a herança da resistência do acesso LA 371-20 aos tospovírus TSWV, GRSV e TCSV, utilizando uma população RC₁F₂; e estudar a sua relação com a resistência conferida por Sw-5, por meio da análise de co-segregação da resistência com o marcador CAPS COS134FR ligado ao gene Sw-5.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e estudos da herança da resistência

Para determinar a herança da resistência observada no acesso LA 371-20 (*L. peruvianum*) foram inoculadas plantas de uma população RC₁F₂ com diferentes isolados de tospovírus. A população RC₁F₂ foi obtida através da autofecundação de uma planta resistente ao isolado V1-3 (TCSV), proveniente do retrocruzamento entre 'Moneymaker' e o híbrido HEP1 ('Moneymaker' x LA 371-20). Foram inoculadas 102 plantas com o isolado AL (TSWV), 67 com o isolado V1-3 (TCSV) e 67 com o isolado CUBIO (GRSV).

Foram plantadas três plantas, com idade aproximada de 15 dias, por vaso de 1,5 L contendo solo esterilizado. As plantas foram inoculadas via extrato foliar tamponado quando apresentavam duas folhas verdadeiras. Nas inoculações foram utilizados os isolados AL, V1-3 e CUBIO da coleção do Laboratório de Patologia Florestal & Genética da Interação Planta-Patógeno/BIOAGRO (Universidade Federal de Viçosa). A identidade desses isolados foi determinada com base em testes biológicos (gama de hospedeiros), sorológicos (DAS-ELISA) e moleculares (clonagem do gene N) (Tabela 1). Os isolados virais foram multiplicados em *Nicotiana tabacum* (L.) cultivar Havana 425. As plantas foram submetidas a duas inoculações via extrato foliar, realizadas com intervalo de sete dias, em casa de vegetação. A segunda inoculação visou reduzir a chance de ocorrência de escapes. O

inóculo consistiu de folhas de 'Havana 425' sistemicamente infectadas, maceradas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, contendo 0,01 M de sulfito de sódio e 0,01% de carborundum (600 mesh). A avaliação da resistência foi feita com base nos sintomas apresentados até 40 dias após a segunda inoculação. Como controle, nas inoculações foram utilizadas a cultivar Moneymaker (suscetível) e a linhagem SW99-1 (resistente), que contém o gene *Sw-5*. O ajuste das proporções de plantas resistentes: suscetíveis ao modelo genético da herança hipotetizado foi avaliado pelo teste de qui-quadrado.

2.2. Análise de co-segregação com o marcador CAPS COS134FR

Para determinar o relacionamento da resistência conferida pelo gene *Sw-5* com a resistência oriunda de LA 371-20, efetuou-se a análise de co-segregação da resistência deste genótipo com o marcador CAPS COS134FR. Este marcador resulta da amplificação da região genômica localizada a 12 Kb do loco *Sw-5* (BROMMONSCHENKEL & TANKSLEY, 1997) via PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos COS134FR e COS134FRF2, e posterior clivagem dos produtos de amplificação com a enzima *DraI*. A análise dos produtos da clivagem por meio da eletroforese em géis de agarose permite distinguir os alelos de *L. esculentum* (Moneymaker) de *L. peruvianum* (LA 371-20).

Para realização do ensaio de PCR, o DNA das plantas foi extraído de acordo com protocolo de FULTON et al. (1995), e a reação de PCR consistiu em 100-200 ng de DNA genômico, 5 µL do tampão de reação 10X, 2 µL da mistura de deoxinucleotídeos (0,01 M), 0,5 µL do oligonucleotídeo COS134FR (10 µM), 0,5 µL do oligonucleotídeo COS134FRF2 (10 µM), 1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (2 a 5 unidades/µL) e água estéril (MiliQ) suficiente para atingir volume final de 50 µL.

Utilizaram-se 35 ciclos de amplificação (termociclador MJ Research modelo PTC-100), cada qual constituído por uma etapa de desnaturação por um minuto a 94°C, anelamento por um minuto a 52°C e extensão por dois minutos e trinta segundos a 72°C. Após a conclusão dos 35 ciclos foi realizada uma extensão final a 72°C, por cinco minutos. Em seguida, a temperatura foi

mantida a 4°C até a retirada das amostras. A fim de confirmar a amplificação, para posterior digestão do fragmento (~800 pb), as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,4%) com tampão TBE (SAMBROOK et al., 1989), contendo 0,2 µM de brometo de etídeo, em uma corrida sob voltagem constante de 70V, por uma hora. O DNA amplificado foi visualizado sob luz ultravioleta, e as imagens foram capturadas e arquivadas em computador utilizando o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene®).

Após a confirmação da amplificação do DNA pela visualização do fragmento de 800 pb, 20 µL da alíquota do produto da amplificação foram utilizados para clivagem com a enzima *DraI*. A esse volume foram adicionados 1 µL da enzima, 3 µL do tampão 10X e água estéril (Mili-Q) suficiente para o volume final de 30 µL. Em seguida, as amostras foram incubadas à temperatura de 37°C por duas horas. Os produtos da clivagem foram analisados em géis de agarose e visualizados conforme descrito anteriormente.

3. RESULTADOS

3.1. Herança da resistência do acesso LA 371-20 (*L. peruvianum*)

Todas as plantas 'Moneymaker', controle suscetível, foram infectadas, enquanto o controle resistente 'SW99-1' não apresentou sintomas de infecção viral nas inoculações com os isolados das três espécies de tospovírus (TSWV, GRSV e TCSV). O número de plantas resistentes: plantas suscetíveis nas amostras da população RC₁F₂ inoculadas com os diferentes isolados virais ajustou-se à proporção 3:1 (p=0,91 para TSWV, p=0,30 para TCSV e p=0,94 para GRSV), indicando que a resistência a tospovírus derivada do acesso LA 371-20 (*L. peruvianum*) é uma característica que possui herança mendeliana simples, de caráter dominante (Tabela 5).

O fenótipo das plantas resistentes da população RC₁F₂ foi similar ao observado na linhagem SW99-1, que contém o gene *Sw-5*. Inúmeras lesões necróticas localizadas nos sítios de infecção foram observadas nas plantas classificadas como resistentes aos diferentes isolados, três a quatro dias após a inoculação. No entanto, a frequência dessas lesões foi maior nas plantas resistentes da população segregante do que nas plantas da linhagem SW99-1; utilizadas como controle (dados não mostrados).

Como o marcador CAPS é co-dominante, avaliou-se o ajuste da segregação desse marcador ao modelo genético de herança monogênica

Tabela 5 - Segregação da resistência a três isolados de tospovírus na população RC₁F₂, obtida pela autofecundação de uma planta do retrocruzamento 'MoneyMaker' x HEP1 ('MoneyMaker' x LA 371-20)

ISOLADO	GERAÇÃO E CONTROLES	FENÓTIPOS OBSERVADOS ¹⁾		HIPÓTESE ²⁾	PROPORÇÃO ESPERADA	χ^2	VALOR P
		R	S				
AL (TSWV)	RC ₁ F ₂	77	25	3:1	76,5:25,5	0,013	0,91
	MoneyMaker	0	12				
	SW99-1	12	0				
V1-3 (TCSV)	RC ₁ F ₂	54	13	3:1	50,25:16,75	1,119	0,29
	MoneyMaker	0	12				
	SW99-1	12	0				
CUBIO (GRSV)	RC ₁ F ₂	50	17	3:1	50,25:16,75	0,004	0,94
	MoneyMaker	0	12				
	SW99-1	12	0				
TOTAL	RC ₁ F ₂	181	55	3:1	177:59	0,361	0,55

¹⁾Foram consideradas resistentes as plantas que não apresentaram qualquer tipo de sintoma de infecção sistêmica até 40 dias após a inoculação. (R) resistente e (S) suscetível.

²⁾Considerando a resistência como monogênica e dominante.

co-dominante, nas diferentes amostras inoculadas. Ao contrário das amostras inoculadas com os isolados AL e CUBIO, não se observou ajuste a esse modelo nas amostras inoculadas com o isolado V1-3 ($p=0,03$) (Tabela 6). Essa discrepância deve-se à predominância de plantas com o alelo derivado de LA 371-20, em função da amostragem.

A perfeita co-segregação do fenótipo da resistência aos diferentes isolados e do marcador CAPS COS134FR (Tabela 7) indica que um mesmo gene é responsável pela resistência às três espécies de tospovírus utilizadas neste estudo e que este gene é um alelo do loco Sw-5 ou de um loco proximamente ligado. Nas 236 plantas analisadas, não foi observada

Tabela 6 - Teste da segregação do marcador molecular CAPS COS134FR ao modelo genético de herança monogênica codominante, nas diferentes sub-populações inoculadas

ISOLADO	GENÓTIPOS OBSERVADOS			HIPÓTESE	PROPORÇÃO ESPERADA	χ^2	VALOR
	p/p ¹⁾	p/e	e/e				P
AL (TSWV)	33	44	25	1:2:1	25,5:51:25,5	3,17	0,20
V1-3 (TCSV)	26	28	13	1:2:1	16,75:33,5:16,75	6,85	0,03
CUBIO (GRSV)	19	31	17	1:2:1	16,75:33,5:16,75	0,49	0,78

¹⁾Genótipo para o marcador CAPS COS134FR: (p/p) homocigoto ou (p/e) heterocigoto para o alelo derivado de *L. peruvianum* LA 371-20 e (e/e) homocigoto para o alelo derivado de *L. esculentum* 'MoneyMaker'.

Tabela 7 - Co-segregação do marcador molecular CAPS COS134RF com o fenótipo da resistência na população RC₁F₂

ISOLADO	FENÓTIPOS/GENÓTIPOS OBSERVADOS				HIPÓTESE ³⁾	PROPORÇÃO ESPERADA	χ^2	VALOR
	R ^{1)/P²⁾}	R/ee	S/P ₋	S/ee				P
AL (TSWV)	77/77	0/0	0/0	25/25	9:3:3:1	57,4:19,1:19,1:6,4	99,4	0,0
V1-3 (TCSV)	54/54	0/0	0/0	13/13	9:3:3:1	37,8:12,5:12,5,:4,2	50,7	0,0
CUBIO (GRSV)	50/50	0/0	0/0	17/17	9:3:3:1	37,8:12,5:12,5,:4,2	68,3	0,0
TOTAL	181/181	0/0	0/0	55/55	9:3:3:1	132,8:44,2:44,2:14,8	215,8	0,0

¹⁾Fenótipo até 40 dias após a inoculação: (R) Resistente e (S) Suscetível.

²⁾Marcador CAPS: (P₋) homocigoto ou heterocigoto para o alelo derivado de *L. peruvianum* LA 371-20 e (ee) homocigoto para o alelo derivado de *L. esculentum*.

³⁾Considerando segregação independente entre o marcador e o gene proveniente de LA 371-20.

recombinação entre o marcador e o loco que contém o gene de resistência (Figura 7).

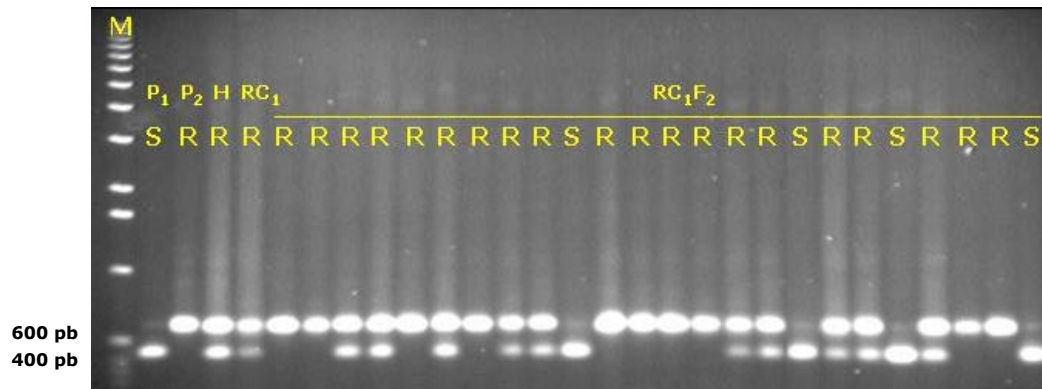


Figura 7 - Produtos da amplificação do DNA de *L. esculentum* 'Moneymaker' (P₁), *L. peruvianum* LA 371-20 (P₂), híbrido HEP1 ('Moneymaker' x LA 371-20)(H), planta resistente do retrocruzamento 'Moneymaker' x HEP1 (RC₁) e plantas da população segregante (RC₁F₂) com os oligonucleotídeos COS134FR e COS134FRF2, após clivagem com a enzima de restrição *Dra*I. É possível observar a perfeita co-segregação do alelo derivado de LA 371-20 com o fenótipo da resistência ao isolado AI (TSWV). M: marcador 1 kb ladder; R = planta resistente e S = planta suscetível.

4. DISCUSSÃO

Em contraste com o observado em outros países, no Brasil o “vira-cabeça-do-tomateiro” é causado por quatro diferentes espécies de tospovírus (TSWV, GRSV, TCSV e CSNV) (COLLARICIO, 2000). Assim, no Brasil, o controle genético da doença demanda a utilização de cultivares ou híbridos com amplo espectro de resistência. Esses cultivares e híbridos podem ser obtidos pela incorporação de um gene capaz de conferir resistência às diferentes espécies ou pela piramidação de genes que conferem resistência a cada uma das diferentes espécies.

Devido à facilidade da introgressão de um gene em comparação a dois ou mais, os melhoristas brasileiros têm utilizado quase que exclusivamente o gene *Sw-5* em programas de melhoramento do tomateiro (POZZER et al., 1996; BOITEUX et al., 1993a; GIORDANO et al., 2000). Todavia, os relatos de isolados capazes de suplantar essa resistência ou de causar necrose sistêmica em plantas heterozigotas ou homozigotas para o gene *Sw-5*, na Austrália (LATHAM & JONES, 1998), nos Estados Unidos (CHO et al., 1996) e no Brasil (LAU 2001; LOURENÇÃO et al., 2001), enfatizam a necessidade da introgressão de novos genes de resistência e a integração da utilização da resistência genética com outras medidas de controle.

Nesse contexto, a resistência a tospovírus derivada de LA 371-20 constitui uma nova opção para o controle de tospovirose no tomateiro. O estudo da herança e a análise com marcadores moleculares demonstraram que

essa resistência é monogênica e efetiva contra isolados pertencentes a três espécies de tospovírus (TSWV, GRSV e TCSV). Além disso, aparentemente, esse gene parece ter características biológicas diferentes de *Sw-5*. LAU (2001), estudando o efeito do número de cópias do alelo *Sw-5* na resistência, relata que o isolado V1-3 (TCSV), inoculado via extrato foliar, pode causar 100% de necrose sistêmica em plantas heterozigotas para o gene *Sw-5* e em 20% das plantas homozigotas resistentes. Esse mesmo isolado não foi capaz de causar necrose sistêmica nas plantas da população RC₁F₂, que continham o gene proveniente de LA 371-20, sugerindo que este gene possui maior penetrância do que *Sw-5*. Contudo, estudos adicionais são necessários para determinar se esse efeito é observado em outros “backgrounds” de *L. esculentum* e também determinar se essa penetrância se mantém nas inoculações por tripses.

Embora não se tenha efetuado um teste de alélismo típico, cruzando-se plantas contendo o gene de resistência derivado de LA 371-20 com plantas contendo o gene *Sw-5* e analisando a progênie das plantas obtidas, a análise de co-segregação com o marcador CAPS COS134FR, que dista aproximadamente 12 kb do loco *Sw-5* (BROMMONSCHENKEL & TANKSLEY, 1997), permitiu demonstrar que este gene é provavelmente uma forma alélica do loco *Sw-5* ou um gene proximamente ligado. A primeira hipótese é mais plausível em razão dos resultados da caracterização molecular do loco *Sw-5*, que demonstrou ser um loco “simplex” (BROMMONSCHENKEL et al., 2000). Esse alelo é provavelmente diferente daquele descrito por ROSELLÓ et al. (2001), uma vez que os acessos LA 371-20 e PE-18 foram coletados em diferentes regiões do Peru (Ancash e Lima, respectivamente) (CUARTERO et al., 1984; <http://tgrc.ucdavis.edu>). Com base na nomenclatura empregada por FINLAY (1953) e cronologia de relato, propõe-se a designação *Sw-5^a*, *Sw-5^b* e *Sw-5^c* para os alelos derivados de ‘Stevens’ e dos acessos PE-18 e LA 371-20 de *L. peruvianum*, respectivamente.

A organização multialélica do loco *Sw-5* facilitará a compreensão dos mecanismos envolvidos na geração de diversidade neste loco. Assim como no caso do alelo *Sw-5^a*, a resistência conferida pelo alelo *Sw-5^c* envolve a elicitação da resposta de hipersensibilidade. Esse tipo de resposta de resistência das plantas a doenças segue o modelo de interação gene-a-gene proposto por FLOR (1971). Segundo esse modelo, o fenótipo da resistência é

decorrente da interação específica entre o gene de resistência na planta e o gene de avirulência no patógeno. Como *Sw-5^a* e demais alelos proporcionam resistência a diferentes espécies de tospovírus, é possível que a proteína de resistência, codificada por estes alelos, possua um domínio conservado capaz de reconhecer também um domínio conservado e presente no genoma ou nas proteínas de avirulência correspondentes dos tospovírus. Como a seqüência do alelo *Sw-5^a* é conhecida (BROMMONSCHENKEL et al., 2000), oligonucleotídeos específicos poderão ser construídos e utilizados na sua amplificação; as seqüências amplificadas poderão ser clonadas, seqüenciadas e comparadas para identificar regiões conservadas entre os alelos, possivelmente envolvidas na interação com a proteína Avr correspondente dos tospovírus.

Os alelos clonados poderiam também ser transferidos para variedades suscetíveis por meio da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Essa metodologia evitaria os incômodos do arraste de ligação (“Linkage drag”), normalmente observados na introgressão de genes derivados de espécies selvagens, pelo método dos retrocruzamentos. Uma vez que o cultivo de plantas transgênicas ainda não foi liberado no Brasil, a ligação de *Sw-5^c* com o marcador CAPS COS134FR e demais marcadores ligados ao loco *Sw-5* pode também ser usada para acelerar a sua incorporação em cultivares comerciais, com um mínimo de “linkage-drag” e sem recorrer a inoculações com o patógeno. Essa possibilidade é interessante, uma vez que a manutenção dos isolados de tospovírus por meio de sucessivas inoculações via extrato foliar leva ao aparecimento de “Defective Interfering RNAs” no inóculo, o que, por sua vez, causa a atenuação de sintomas, dificultando a correta identificação das plantas resistentes (DE ÁVILA, 1993).

A princípio, *Sw-5^c* representa uma alternativa para o desenvolvimento de cultivares de tomateiro com resistência de amplo espectro contra tospovírus. No entanto, estudos adicionais, como a avaliação de sua eficácia na condição heterozigota, em diferentes condições de temperatura, e perante inoculações realizadas por tripes, são necessários para prever a sua eficácia em nível de campo.

3. CONCLUSÃO GERAL

O gene *Sw-5*, principal gene de resistência a tospovírus utilizado nos programas de melhoramento, não é completamente efetivo em heterozigose e, ou, em condições de alta pressão de inóculo. Como resistência de amplo espectro a tospovírus foi identificada nos acessos LA 444/1, LA 371, PI 126444, PI 126928 e PI 126944 de *L. peruvianum* e LA 130 e LA 2753 de *L. chilense* (LIMA, 2001), sexualmente incompatíveis com o tomateiro cultivado, este trabalho teve por objetivos: superar a barreira interespecífica nesses cruzamentos utilizando a técnica de cultivo *in vitro* de sementes imaturas (IMANISHI, 1988); e determinar a herança da resistência do acesso LA 371-20.

O cultivo *in vitro* de sementes imaturas foi utilizado com sucesso, obtendo-se híbridos interespecíficos para a maioria dos cruzamentos realizados. O valor percentual médio de germinação foi de 0,25%. Obtiveram-se cinco híbridos do cruzamento *L. esculentum* x LA 130-5; quatro do cruzamento *L. esculentum* x LA 2753-11; quatro do cruzamento *L. esculentum* x LA 371-20; cinco do cruzamento *L. esculentum* x LA 444/1-19; um do cruzamento *L. esculentum* x PI 126944-6; e um do cruzamento *L. esculentum* x PI 126944-12. Apenas para os cruzamentos entre *L. esculentum* e os acessos de *L. peruvianum* PI 126444-3 e PI 126928-2 não se obteve nenhum híbrido, provavelmente devido a uma maior incompatibilidade nesses cruzamentos. Características morfológicas de folha, fruto e flores evidenciaram a natureza

híbrida das plantas obtidas. Através do uso de marcador molecular CAPS, foi possível confirmar que todas as plantas obtidas através do cultivo *in vitro* eram verdadeiramente híbridas. Para avaliação da resistência, os híbridos foram propagados vegetativamente, mediante o processo de estaquia, e inoculados via extrato foliar tamponado com isolados de tospovírus pertencentes às espécies *Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Groundnut ringspot virus* – GRSV e *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV. As plantas foram avaliadas visualmente, mediante observação dos sintomas até 35 dias após a segunda inoculação. Para confirmar os resultados da análise fenotípica, foi realizado o teste sorológico DAS-ELISA para o isolado de TSWV. Apenas os híbridos do cruzamento entre *L. esculentum* x LA 371-20 e *L. esculentum* x PI 126944-6 foram resistentes aos três isolados de tospovírus utilizados. Os demais híbridos foram resistentes aos isolados das espécies GRSV e TCSV, mas suscetíveis ao isolado da espécie TSWV. Populações de retrocruzamento 1 foram obtidas com sucesso também utilizando-se do cultivo de semente imatura. A obtenção dessas populações foi relativamente mais fácil comparando-se com a obtenção dos híbridos, com percentual de germinação de 2,07%. A geração RC₁ mostrou grande fertilidade, não sendo necessário o cultivo de sementes imaturas para obtenção das populações RC₁F₂ e RC₂.

O estudo da herança da resistência em uma população RC₁F₂ derivada do híbrido *L. esculentum* x LA 371-20 indicou que a resistência originária dessa fonte é condicionada por um gene dominante e é efetiva contra isolados pertencentes a três espécies de tospovírus (TSWV, GRSV e TCSV). A análise genética dessa progênie com um marcador molecular CAPS ligado ao gene *Sw-5* demonstrou que o gene de resistência derivado do acesso LA 371-20 é alelo do loco *Sw-5* ou de um outro loco ligado muito próximo. O gene proveniente do acesso LA 371-20 representa uma alternativa para o desenvolvimento de cultivares de tomateiro com resistência de amplo espectro contra tospovírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA M. M. F., HERMSEN, J. G. T. Unilateral incompatibility: hypotheses, debate and its implications for plant breeding. **Euphytica**, v.21, p.32-47, 1972.
- ALEXANDER, L. J. Transfer of a dominant type of resistance to the four known Ohio pathogenic strains of tobacco mosaic virus (TMV) from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum*. **Phytopathology**, v.53, p.869, 1963.
- BARBANO, P. P., TOPOLESKI, L. D. Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* ovules. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.109, n.1, p.95-100, 1984.
- BEZERRA, I. C., RESENDE, R. de O., POZZER, L., NAGATA, T., KORMELINK, R., DE ÁVILA, A. C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, v.89, p.823-830, 1999.
- BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, v.71, p.151-154, 1993.
- BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. B., DE ÁVILA, A. C., SANTOS, J. R. M. 'TSW 10': Linhagem de tomate para mesa resistente a três espécies de tospovírus causadoras do 'vira-cabeça'. **Horticultura Brasileira**, v.11, n.2, p.163-164, 1993a.
- BOITEUX, L. S., NAGATA, T., GIORDANO, L. B. Field resistance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) lines to tomato spotted wilt disease. **Tomato Genetics of the Cooperative Reports**, v.43, p.7-9, 1993b.

- BROMMONSCHENKEL, S. H., TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. **Molecular General Genetics**, v.256, p.121-126, 1997.
- BROMMONSCHENKEL, S. H., FRARY, A., TANKSLEY, S. D. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. **Molecular and Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.10, p.1130-1138, 2000.
- CAMARGO FILHO, W. P., MAZZEI, A. R. Mercado mundial de tomate e o mercosul. **Informações Econômicas**, v.27, n.10, p.25-38, 1997.
- CHEN, L. Z., IMANISHI, S. Cross-compatibility between the cultivated tomato *Lycopersicon esculentum* and the wild species *L. peruvianum*, *L. chilense* assessed by ovule culture *in vitro*. **Japanese Journal of Breeding**, v.41, p.223-230, 1991.
- CHEN, L. Z., ADACHI, T. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via 'embryo rescue' and *in vitro* propagation. **Plant Breeding**, v.115, n.4, p. 251-256, 1996.
- CHO, J. J., CUSTER, D. M., BROMMONSCHENKEL, S. H., TANKSLEY, S. D. Conventional breeding: Host-plant resistance and use of molecular markers to develop resistance to tomato spotted wilt virus in vegetables. **Acta Horticulturae**, v.431, p.367-378, 1996.
- COLARICCIO, A., EIRAS, M., CHAVES, A. L. R., LOURENÇÃO, A. L., MELO, A. M. T., SIQUEIRA, W. J. Detecção do *Chrysanthemum stem necrosis virus* em tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, v.26, p.252-254, 2000.
- CUARTERO, J., NUEZ, F., DÍAZ, A. Catalog of collections of *Lycopersicon* and *L. pennellii* from northwest of Peru. **Tomato Genetics of the Cooperative Reports**, v.34, p.43-46, 1984.
- DE ÁVILA, A. C. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): Organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. **Horticultura Brasileira**, v.11, p.211-227, 1993.
- DE HAAN, P., KORMELINK, R., RESENDE, R. O., VAN POELWIJK, F., PETERS, D., GOLDBACH, R. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal General of the Virology**, v.71, p.1001-1007, 1991.
- DÍEZ, M'J., ROSELLÓ, S., JORDÁ, C., LACASA, A., COSTA, J., NUEZ, F. Agronomic behavior of resistant tomato cultivars and lines to TSWV and influence of inoculation methods. **Acta Horticulturae**, v.412, p.527-532, 1995.

- DOGANLAR, S., FRARY, A., TANKSLEY, S. D. Production of interspecific F₁ hybrids, BC₁, BC₂ and BC₃ populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of *Lycopersicon peruvianum* carrying new root-knot nematode resistance genes. **Euphytica**, v.95, p.203-207, 1997.
- DUVAL, C. M., CALDAS, L. S., CUPERTINO, F. P. Obtenção por cultura de embriões de híbridos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum*, resistentes a tospovírus. **Horticultura Brasileira**, v.11, n.1, p.14-17, 1993.
- EGASHIRA, H., ISHIHARA, H., TAKASHINA, T., IMANISHI, S. Genetic diversity of the 'peruvianum-complex' (*Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. and *L. chilense* Dun.) revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, v.116, p.23-31, 2000.
- EIRAS, M., RESENDE, R. O., DE ÁVILA, A. C. Estratégia para a detecção de tospovírus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.1, p.69-73, 2001.
- FAJARDO, T. V. M., DE ÁVILA, A. C., RESENDE, R. O. Doenças causadas por vírus em tomate. In: ZAMBOLIM, L., VALE, F. X. R., COSTA, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas - Hortaliças**. Viçosa, vol. 2, 2000. p.843-877,
- FAJARDO, T. V. M., LOPES, C. A., SILVA, W. L. C., DE ÁVILA, A. C. Dispersão da doença e redução da produção em tomateiro infectado por tospovírus no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.413-418, 1997.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p.
- FINLAY, K. W. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. **Australian Journal Biological Science**, v.6, p.153-163, 1953.
- FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.
- FULTON, T. M., CHUNWONGSE, J., TANKSLEY, S. D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.13, n.3, p.207-209, 1995.
- GARCIA, L. E., BRANDENBURG, R. L., BAILAEY, J. E. Incidence of tomato spotted wilt tospovirus (*Bunyaviridae*) and tobacco thrips in Virginia-types peanuts in North Carolina. **Plant Disease**, v.84, n.4, p.459-464, 2000.
- GERMAN, T. L., ULLMAN, D. E., MOYER, J. W. *Tospoviruses*: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.315-348, 1992.

- GIORDANO, L. B., RIBEIRO, C. S. C. Origem botânica e composição química do fruto. In: SILVA, J. B. C., GIORDANO, L. B. (Eds.) **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. p.12-17.
- GIORDANO, L. B., SILVA, J. B. C., BARBOSA, V. Escolha de cultivares e plantio. In: SILVA, J. B. C., GIORDANO, L. B. (Eds.) **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. p.36-59.
- GIORDANO, L. B., DE ÁVILA, A. C., CHARCHAR, J. M., BOITEUX, L. S. "Viradoro": A tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. **HortScience**, v.35, n.7, p.1368-1370, 2000.
- GIORDANO, L. B., SILVA, C. Hibridação em tomate. In: BORÉM, A. (Ed.) **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p.463-480.
- GOLDBACH, R., PETERS, D. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. **Seminars in Virology**, v.5, p.113-120, 1994.
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v.8, n.10, p.1773-1791, 1996.
- HOGENBOOM, N. G. Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for non-functioning of intimate partner relationships. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**. v.188, n.1092, p.361-374, 1975.
- HOGENBOOM, N. G. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 1. The genus *Lycopersicon*, its breeding barriers and the importance of breaking these barriers. **Euphytica**, v.21, p.221-227, 1972a.
- HOGENBOOM, N. G. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 3. Inheritance of self-compatibility in *L. peruvianum* (L.) Mill. **Euphytica**, v.21, p.244-256, 1972b.
- HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas**. (Tradução de Coradin, L.) Brasília: Embrapa/CENARGEM, 1992. 52p.
- HOLMES, F.O. Resistance to spotted wilt in tomato. **Phytopathology**, v.38, n.6, p.467-473, 1948.
- IZUKA, N., BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. B., NAGATA, T., DUSI, A. N. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in wild *Lycopersicon* species. **Tomato Genetics of the Cooperative Reports**, v.43, p.20-22, 1993.
- IMANISHI, S., EGASHIRA, H., TANAKA, H., HARADA, S., NISHIMURA, R., TAKAHASHI, S., TAKASHINA, T., OUMURA, S. Development of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* var. *humifusum* and introgression of *L. peruvianum* invertase gene into *L. esculentum*. **Breeding Science**, v.46, p.355-359, 1996.

- IMANISHI, S. Efficient ovule culture for the hybridization of *Lycopersicon esculentum* and “peruvianum-complex”. **Proceedings of the ICOBB in Miyazaki**, p.97-104, 1991.
- IMANISHI, S. Efficient ovule culture for the hybridization of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*, *L. glandulosum*. **Japanese Journal of Breeding**, v.38, p.1-9, 1988.
- IMANISHI, S., WATANABE, Y., HIURA, I. A simple and efficient method for interspecific hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. **Journal of the Yamagata Agriculture and Forestry Society**, v.42, p.13-15, 1985.
- KALLOO, G. **Vegetable breeding**. Boca Raton: CRC Press, Vol. 1, 1988. 239p.
- KALLOO, G. Interspecific and intergeneric hybridization in tomato. In: KALLOO, G. (Ed.) **Genetic improvement of tomato**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.73-82.
- KIKUTA, K., HENDRIX, J. W., FRAZIER, W. A. Pearl Harbor, a tomato variety resistant to spotted wilt in Hawaii. **University of Hawaii Agricultural Experiment Station Circ.**, v.24, 1945.
- KONIECZNY, A., AUSUBEL, F. M. A procedure for mapping Arabdopsis mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. **Plant Journal**, v.4, p.403-410, 1993.
- KUMAR, N. K. K., ULLMAN, D. E., CHO, J. J. Evaluation of *Lycopersicon* germ plasm for tomato spotted wilt tospovirus resistance by mechanical inoculation and thrips transmission. **Plant Disease**, v.77, n.9, p.938-941, 1993.
- LATHAM, L. J., JONES, R. A. C. Selection of resistance breaking strains of tomato spotted wilt tospovirus. **Annals of Applied Biology**, v.133, n.3, p.385-402, 1998.
- LAU, D. **Análise de fatores que influenciam a resistência a tospovírus conferida pelo gene Sw-5 em tomateiro e tabaco**. Viçosa, MG: UFV, 2001, 84p. Dissertação (Tese de mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LIMA, G. S. A. **Resistência a tospovírus, clonagem e caracterização molecular de alelos do loco Sw-5 em espécies de *Lycopersicon***. Viçosa, MG: UFV, 2001, 91p. Dissertação (Tese de doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LIMA, M. F., DE ÁVILA, A. C., RESENDE, R. O., NAGATA, T. Levantamento e identificação de espécies de tospovírus em tomateiro e pimentão no submédio do Vale São Francisco e no Distrito Federal. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p.205-210, 2000.

- LEFRANÇOIS, C., CHUPEAU, Y., BOURGIN, J. P. Sexual and somatic hybridization in the genus *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.533-546, 1993.
- LOPES, C. A., SANTOS, J. R. M., DE ÁVILA, A. C., CHARCHAR, J. M., QUEZADO-DUVAL, A. M. Doenças: Identificação e controle. In: SILVA, J. B. C., GIORDANO, L. B. (Eds.) **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 168 p.
- LOPES, C. A., SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa CNPH / Embrapa SPI, 1994. 67p.
- LOURENÇÃO, A. L., SIQUEIRA, W. J., MELO, A. M. T., MELO, P. C. T., COLARICCIO, A., FONTE, L. C., CHAVES, A. L. R. Avaliação da resistência a tospovírus em cultivares e linhagens de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.1, p.17-23, 2001.
- LOURENÇÃO, A. L., NAGAI, H., SIQUEIRA, W. J., MELO, A. M. T. de, FILHO, J. A. U., FONTE, L. C., MELO, P. C. T. Resistência de linhagens avançadas de tomateiro a tospovírus. **Bragantia**, v.58, n.2, p.293-303, 1999.
- MAHAESWARAN, G., PERRYMAN, T., WILLIAMS, E. G. Use of an interspecific hybrid in identifying a new allelic specificity generated at the self-incompatibility locus after inbreeding in *Lycopersicon peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.73, n.2, p.236-245, 1986.
- MILLER, J. C., TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.437-448, 1990.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NAGATA, T., MOUND, L. A., FRANÇA, F. F., DE ÁVILA, A. C. Identification and rearing of four thrips species vectors of *Tospovirus* in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.3, p.535-539, 1999.
- NAGATA, T., DE ÁVILA, A. C., TAVARES, P. C. DE M., BARBOSA, C. DE J., JULIATTI, F.C., KITAJIMA, E. W. Occurrence of different tospovirus species in six states of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, n.1, p.90-95, 1995.
- NEAL, C. A., TOPOLESKI, L. D. Effects of the basal medium on the growth of immature tomato embryos *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.108, n.3, p. 434-438, 1983.

- NETTANCOURT, D. DE, DEVREUX, M., LANERI, U., CRESTI, M., PACINI, E., SARFATTI, G. Genetical and ultrastructural aspects of self and cross incompatibility in interspecific hybrids between self-compatible *L. esculentum* and self-incompatible *L. peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.44, p.278-288, 1974.
- PAIVA, J. R., VALOIS, A. C. C. Espécies selvagens e sua utilização no melhoramento. In: NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., MELO, I. S., VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.) **Recursos Genéticos & Melhoramento-Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.79-89.
- PATERSON, R. G., SCOTT, S. J., GERGERCH, R. C. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. **Euphytica**, v.43, p.173-178, 1989.
- PETERS, D., WIJKAMP, I., VAN DE WETERING, F., GOLDBACH, R. Vector relations in the transmission and epidemiology of tospoviruses. **Acta Horticulturae**, v.431, p.29-43, 1996.
- PICÓ, B., HERRAIZ, J, RUIZ, J. J., NUEZ, F. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. **Scientia Horticulturae**, v.1757, p.1-17, 2002.
- PICÓ, B., FERRIOL, M., DÍEZ, M. J., NUEZ, F. Developing tomato breeding lines resistant to tomato yellow leaf curl virus. **Plant Breeding**, v.118, p.537-542, 1999.
- POZZER, L., BEZERRA, I. C., KORMELINK, R., PRINS, M., PETERS, D., RESENDE, R. O., ÁVILA, A. C. Characterization of a distinct tospovirus isolate of iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. **Plant Disease**, v.83, p.345-350, 1999.
- POZZER, L., RESENDE, R DE O., LIMA, M. I., KITAJIMA, E., GIORDANO, L. B., DE ÁVILA, A. C. *Tospovirus*: uma visão atualizada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.95-148, 1996.
- POYSA, V. The development of bridge lines for interspecific gene transfer between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.79, p.187-192, 1990.
- RIBEIRO, C. S. C., GIORDANO, L. B. Método de obtenção de híbridos interespecíficos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.5, p.793-799, 2001.
- RICK, C. M., LATERROT, H., PHILOUZE, J. A revised key for the *Lycopersicon* species. **Tomato Genetics of the Cooperative Reports**, v.40, p.31, 1990.
- RICK, C. M. Reproductive isolation in the *Lycopersicon peruvianum* complex. In: D'ARCY, W. D. (Ed.) **Solanaceae: biology and systematics**. New York: Colombia University Press, 1986. p.477-495.

- RICK, C. M. Crossability between *L. esculentum* and a new race of *L. peruvianum*. **Tomato Genetics of the Cooperative Reports**, v.33, p.13, 1983.
- RICK, C. M. The potential of exotic germplasm for tomato improvement. In: VASIL, J. K., SCROWCROFT, W. R., FREY, K. J. (Eds.) **Plant improvement and somatic cell genetics**. New York: Academic Press, 1982. p.1-28.
- RICK, C. M. Biosynthetic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. In: . HAWKES, J. C., LESTER, R. N., SKELDING, A. D. (Eds.) **The biology and taxonomy of the solanaceae**. New York: Academic Press, 1979. p. 667-668.
- ROSELLÓ, S., RICARTE, B., DÍEZ, M. J., NUEZ, F. Resistance to tomato spotted wilt virus introgressed from *Lycopersicon peruvianum* in line UPV 1 may be allelic to *Sw-5* and can be used to enhance the resistance of hybrids cultivars. **Euphytica**, v.119, p.357-367, 2001.
- ROSELLÓ, S., SOLER, M., DIEZ, M. J., RAMBLA, J. L., RICHARTE, C., NUEZ, F. New sources for high resistance of tomato to the tomato spotted wilt virus from *Lycopersicon peruvianum*. **Plant Breeding**, v.118, p.425-429, 1999.
- ROSELLÓ, S., DÍEZ, M. J., NUEZ, F. Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p. 499-509, 1998.
- ROSELLÓ, S., DÍEZ, M. J., LACASA, A., JORDÁ, C., NUEZ, F. Testing resistance to TSWV introgressed from *Lycopersicon peruvianum* by artificial transmission techniques. **Euphytica**, v.98, p.93-98, 1997.
- ROSELLÓ, S., DÍEZ, M.J., NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop I. The tomato spotted wilt virus – a review. **Scientia Horticulturae**, v.67, p.117-150, 1996.
- SACKS, E. J., GERHARDT, L. M., GRAHAM, E. B., JACOBS, J., THORRUP, T. A., ST CLAIR, D. A. Variation among 41 genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crossability to *L. peruvianum* (L.) Mill. **Annals of Botany**, v.80, p.469-477, 1997.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press – USA, 1989.
- SAMUEL, G., BALD, J. G., PITTMAN, H. A. Investigation on spotted wilt of tomatoes. **Australian Council Science Industry Research Bulletin**, v.44: p.64, 1930.
- SMITH, P. G. Embryo culture of a tomato species hybrid. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.44, p.413-416, 1944.

- STEVENS, M.R., CANADY, M., BARINEAU, M. What we know about tospovirus resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) derived from the wild specie *L. chilense*. In: PETERS, D., GOLDBACH, R. (Eds.) **Recent progress in Tospovirus and Thrips research**, 1998. p.19-20.
- STEVENS, M. R., SCOTT, S. J., GERGERICH, R. C. Evaluation of seven *Lycopersicon* species for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV). **Euphytica**, v.80, p.79-84, 1994.
- STEVENS, M.R., SCOTT, S.J., GERGERICH, R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, v.59, p.9-17, 1992.
- STEVENS, M. A., RICK, C. M. Genetics and breeding. In: ATHERTON, J. G., RUDICH, J. (Eds.) **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, 1986. p.34-109.
- STEVENS, J. M. Tomato Breeding. **Project Report W-Vv1**, Dept. Agricultural Technical Services. Republic of South Africa, 1964.
- THOMAS, B. R., PRATT, D. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.59, p.215-219, 1981.
- YAMAKAWA, K. Effect of chronic gamma radiation on hybrid *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. **Gamma Field Symposia**, v.10, p.11-30, 1971.
- YOUNG, N. D., ZAMIR, D., GANAL, M. W., TANKSLEY, S. D. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2a gene in tomato. **Genetics**, v.120, p.579-585, 1988.
- WILLIAMS, L. V., LAMBERTINI, P. M. L., SHOHARA, K., BIDERBOST, E. B. Occurrence and geographical distribution of tospovirus species infecting tomato crops in Argentina. **Plant Disease**, v.85, n.12, p.1227-1229, 2001.
- WIJKAMP, I., ALMARZA, N., GOLDBACH, R., PETERS, D. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, v.85, n.10, p.1069-1074, 1995.
- ZAMIR, D. EKSTEIN-MICHELSON, I., ZAKAY, Y., NAVOT, N., ZEIDAN, M., SARFATTI, M., ESHED, Y., HAREL, E., PLEBEN, T., VAN-OSS, H., KEDAR, N., RABINOWITCH, H. D., CZOSNECK, H. Mapping and **introgressions of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene Ty-1**. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.141-146, 1994.
- ZITTER, T. A. Diseases caused by viruses. In: JONES, J. B., JONES, J. P., STALL, R. E., ZITTER, T. A. (Eds.) **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, 1991. p.13-42.