**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento de marcador molecular para resistência a
Tobacco mosaic virus e herança da resistência a
Meloidogyne incognita raça 3 em tabaco**

Raphaelle Komatsu Dalla Valle

**Dissertação apresentada para obtenção de título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia**

**Piracicaba
2008**

Raphaelle Komatsu Dalla Valle
Engenheiro Agrônomo

**Desenvolvimento de marcador molecular para resistência a *Tobacco mosaic virus*
e análise da herança da resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em tabaco**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

**Dissertação apresentada para obtenção de título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia**

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Dalla Valle, Raphaelle Komatsu

Desenvolvimento de marcador molecular para resistência a *Tobacco mosaic virus* e herança da resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em tabaco / Raphaelle Komatsu Dalla Valle. - - Piracicaba, 2008.

55 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Fumo 2. Marcador molecular 3. Nematóides 4. Resistência genética vegetal 5. Vírus de plantas I. Título

CDD 633.71
D144d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Ao meu pai pelo apoio constante e à minha mãe

Aos meus irmãos pelo incentivo

Aos meus familiares

Aos verdadeiros amigos

Dedico

Ao Ivan pelo companheirismo, paciência
e apoio constante

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação e dedicação.

Ao Prof. Dr. Jorge Marques Rezende e ao pessoal do laboratório de Virologia Vegetal pelas sugestões, apoio e dedicação para execução deste trabalho.

A Dra. Claudia Barros Monteiro pela minha introdução na vida científica, amizade e exemplo de competência e profissionalismo.

Ao meu tio Carlos e minha tia Maria Aparecida pelo apoio e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Alessandra, Ana Paula, Bruno, Ana Carolina, Cynthia, Daniel, Daniela Truffi, Érika, Fátima, Fabrício, Flávia, Fernanda, Júlia, Juliana, Lara, Leandro, Lilian, Marcelo Zerillo, Márcia, Maria Cristina, Reinaldo, Thayne, Vyvian, pelo companheirismo e amizade durante todos esses anos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelo apoio na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Carmem, Edivaldo, Fernanda, Heloísa, Jefferson, Liliane, Pedro e Rodolfo pelo auxílio.

A empresa Souza Cruz S.A. pelo apoio financeiro e técnico na execução deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Eduardo Pulcinelli, Lucia Lopes Scuciato, Angenilson Defrate e demais funcionários do Centro de Melhoramento de Fumo.

Ao Prof. Dr. Mario Inomoto e Dra. Andressa Zamboni Machado pelo apoio na execução deste trabalho.

A todos meus colegas do curso de pós-graduação em Fitopatologia pela amizade, companheirismo e bons momentos vividos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

“Toda nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos.

Albert Einstein (1879 – 1955)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO	12
2.1 Revisão de bibliográfica.....	12
2.1.1 A produção de tabaco	12
2.1.2 <i>Tobacco mosaic virus</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	14
2.1.3 Resistência a TMV derivada de <i>N. glutinosa</i>	16
2.1.4 O gene N	17
2.1.5 Marcadores moleculares	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material vegetal	21
3.1.1 Populações segregantes para resistência a TMV	21
3.1.2 Paineis de cultivares comerciais.....	21
3.1.3 Populações segregantes F2 e retrocruzamento (RC1F1) para avaliação da resistência a <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3	22
3.2 Avaliação da resistência a TMV	23
3.3 Avaliação da herança da resistência a raça 3 de <i>Meloidogyne incognita</i>	24
3.4 Desenvolvimento de marcador molecular para o gene N	25
3.4.1 Extração de DNA	25
3.4.2 Desenvolvimento de marcador para o gene N e genotipagem	26
3.5 Análise de ligação entre marcador molecular e genes de resistência	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 <i>Tobacco mosaic virus</i>	28
4.1.1 Avaliação de resistência das populações RC1F1 e F2 a TMV.....	28
4.1.2 Avaliação da resistência de cultivares de tabaco a TMV.....	30
4.1.3 Genotipagem da população F2 utilizando marcador para o gene N	34
4.1.4 Análise de ligação entre marcador candidato e gene N	36
4.1.5 Validação do marcador em cultivares comerciais	38
5 <i>Meloidogyne incognita</i>	40

5.1 Avaliação a <i>M. incognita</i> das populações segregantes RC1F1 e F2	40
6 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS	52

RESUMO

Desenvolvimento de marcador molecular para resistência a *Tobacco mosaic virus* e herança da resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3 em tabaco

Este projeto objetivou desenvolver um marcador molecular ligado ao gene de resistência a *Tobacco mosaic virus* (TMV), em vista da necessidade de aprimorar os métodos de melhoramento de plantas para atender crescentes demandas de produtividade. O outro objetivo deste trabalho foi a avaliação de uma população segregante F2 e de retrocruzamento (RC1F1) a *Meloidogyne incognita* raça 3, oriunda do cruzamento das cultivares comerciais Coker 176 (C176) e Coker 371 Gold (C371G). Para o desenvolvimento do marcador ligado ao gene de resistência a TMV, o gene N, foram desenvolvidos iniciadores específicos para regiões conservadas (TIR, NBS e LRR) deste gene com base em sua seqüência. Estes iniciadores foram utilizados para amplificar um marcador cuja ligação ao referido gene foi confirmada em 200 indivíduos de população segregante F2 oriunda do cruzamento entre uma linhagem resistente (Coker176) e outra suscetível ao vírus (Kentucky326). A proporção entre o número de plantas resistentes e suscetíveis (154:46) não diferiu estatisticamente daquela esperada no caso de segregação de um gene dominante de resistência, que seria de 3:1. Os resultados indicaram que o marcador e o gene estão proximamente ligados segundo taxa de recombinação, que foi de 1%. Na avaliação da hereditariedade a *M.incognita* utilizou-se 141 indivíduos da população segregante F2 oriunda do cruzamento entre uma linhagem resistente (Coker176) e suscetível (Coker 371G) e 138 indivíduos de RC1F1 ([C176 X C371G] X C371G). Os resultados obtidos entre a proporção entre o número de plantas resistentes e suscetíveis da população F2 (102:39) e da RC1F1 (67:71) não diferiu estatisticamente daquela esperada no caso de segregação de um gene dominante de resistência.

Palavras-chave: Fumo; Gene N; Marcador perfeito; LRR; Nematóide de galhas

ABSTRACT

Development of molecular marker for resistance to *Tobacco mosaic virus* and heredity of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in tobacco

The aim of this study is to develop a molecular marker linked to the resistant gene to *Tobacco mosaic virus* (TMV) considering the necessity to improve plant breeding to meet growing demands of productivity. The other goal of this study is to evaluate the mode of inheritance of an F2 segregating population and backcross (BCF1) population of *Meloidogyne incognita* race 3 originated from cross breeding between commercial cultivars Coker 176 and Coker 371 Gold. For the development of the marker linked to the TMV resistant gene, the N gene, specific primers of this gene were developed for conserved regions (TIR, NBS and LRR) based on their sequence. These primers were used to amplify a marker whose connection with the aforementioned gene was confirmed in 200 individuals in a segregating F2 population originated from the cross breeding between a resistant cultivar (Coker176) and another cultivar which is susceptible to the virus (Kentucky326). The proportion between the number of resistant and susceptible plants (154:46) did not statistically differ from the one expected in the segregation of one dominant resistance, which would be a 3:1 segregation ratio. The results indicated that the marker and the gene are narrowly linked according to recombination ratio 1%. In the heredity evaluation of resistance to *M.incognita* 141 plants of the segregating F2 population originated from the cross breeding of a resistant (Coker176) and susceptible cultivar (Coker 371G) and 138 plants of backcross BC1F1 ([C176 X C371G) X C3371G) were used. The outcome of the proportion between the number of resistant and susceptible plants of segregating F2 (102:39) and BC1F1 population (67:71) were not statistically different from the ones expected for a monogenic dominant resistance.

Keywords: Tobacco; N gene; Perfect marker; LRR; Root-knot nematode

1 INTRODUÇÃO

Nicotiana tabacum L. é uma espécie tetraplóide resultante da hibridização de *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tomentosiformis*. *Nicotiana* pertence à família das solanáceas e subdivide-se em três subgêneros: *Rustica*, *Tabaccum* e *Petunioides* (GOODSPEED, 1954 apud REN; TIMKO, 2001). O gênero *Nicotiana*, além da relevância econômica, é considerado um importante modelo para estudo na área de biotecnologia e, ainda, como auxiliar em estudos que envolvem princípios de resistência a doenças, síntese de metabólitos secundários e fisiologia de plantas (BINDLER et al., 2007).

A indústria do tabaco possui grande importância para a agroindústria brasileira devido à contribuição de impostos e geração de empregos para aproximadamente 184 mil famílias na cultura do fumo nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SINDICATO DA INDÚSTRIA DO FUMO - SINDIFUMO, 2007). Atualmente, as viroses são os principais problemas da cultura do tabaco, destacando-se o *Tobacco mosaic virus* (TMV), uma partícula viral altamente estável e de distribuição mundial. O TMV causa prejuízos devido à redução da área foliar, rugosidade e malformação. Além disso, plantas doentes podem apresentar maiores teores de nicotina comparadas à plantas sadias. Outro patógeno importante é o nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*), pois a inexistência de áreas indenadas é decorrente do grande número de hospedeiros parasitados por esta espécie. Perdas ocorrem devido a danos ao sistema radicular, alterando o desenvolvimento das plantas (MASSOLA et al., 2005). A medida de controle para TMV e *M. incognita* é a utilização de cultivares resistentes. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou desenvolver marcador molecular para o gene N de resistência a TMV e analisar o modo de resistência a raça 3 de *M. incognita*.

O desenvolvimento de marcador molecular ligado ao gene N baseou-se na disponibilidade da sequência do gene na literatura (WHITHAM et al, 1994). Iniciadores específicos foram desenhados para regiões conservadas deste gene e estes foram utilizados para amplificação de segmentos do gene em plantas de uma variedade resistente (C176) e outra suscetível (K326), indivíduos de uma população segregante F2 (C176 X K326) oriunda do cruzamento destas variedades e um painel de cultivares de tabaco comerciais.

Na avaliação do modo de herança da resistência a raça 3 de *M.incognita* foram utilizados 144 indivíduos da população segregante F2 oriunda do cruzamento entre uma variedade resistente (Coker176) e uma suscetível (Coker 371G) e 137 indivíduos do retrocruzamento com o genitor suscetível [C176 X C371G] X C371G).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A produção de tabaco

O tabaco ou fumo, como é conhecido vulgarmente, é cultivado há centenas de anos pelo homem. Entretanto, existem duas correntes sobre a difusão da fumicultura pelo mundo, uma delas afirma que o fumo é originário das Américas e a outra afirma que descende de plantas utilizadas como fumo na Ásia desde o século IX, provavelmente em cachimbos (SINDIFUMO, 2007). Atualmente, admite-se que a planta é originária dos vales orientais dos Andes bolivianos, difundindo-se pelo território brasileiro através das migrações indígenas, sobretudo da nação Tupi-Guarani. Para os índios brasileiros, o fumo possui caráter sagrado e seu uso era originalmente limitado a ritos religiosos e fins medicinais (SINDIFUMO, 2007).

O tabaco constitui um dos produtos vegetais mais importantes da economia de vários países. O aumento da safra em 70% nos últimos anos garantiu ao Brasil o segundo lugar na produção mundial. A safra 2006/07 foi marcada por uma melhora quantitativa e qualitativa devido ao equilíbrio dos teores de alcalóides. A produção foi de 760 mil toneladas, com produtividade média de 2.099 quilos por hectare numa área total de 362 mil hectares, envolvendo diretamente 184 mil famílias produtoras, além dos empregos gerados na indústria, varejo, logística e outros segmentos (SINDIFUMO, 2007). Para a estrutura da agricultura familiar do Sul do país, o fumo representa alta rentabilidade em relação às culturas alternativas, sendo nove vezes maior que a renda gerada pelo cultivo do milho e 15 vezes a do feijão, segundo dados da Associação dos Fumicultores do Brasil (AFUBRA, 2007).

O principal produtor continua sendo a China, seguido do Brasil, Índia, Estados Unidos, Zimbábue e Indonésia. O mercado se mantém estável por mais de 10 anos, porém, as últimas safras registraram mudanças que favoreceram as exportações do Brasil, como por exemplo, a queda da produção no Zimbábue devido a adversidades climáticas, que favoreceu a exportação brasileira de fumo do tipo *flavor*. Outros fatores

de variação são a redução de subsídios de alguns países europeus para a produção e o aumento das restrições da legislação antitabagista (SINDIFUMO, 2007).

O estado com maior produção é o Rio Grande do Sul, com 50% do total, seguido de Santa Catarina (33%) e Paraná (17%). No nordeste são produzidos os fumos escuros, cuja colheita na safra 2005/06 foi de 38 mil toneladas (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Estes são destinados à fabricação de charutos, cigarrilhas e fumo de corda. No mercado internacional, o Brasil é o líder em exportação. Em 2007, exportou aproximadamente 640 mil toneladas, cerca de 84,2% do produto colhido da safra 2006/07, gerando a receita de US\$ 2 bilhões. Houve um aumento significativo nas exportações se comparado ao volume de 558,6 mil toneladas em 2006. Atualmente, o Brasil exporta cerca de 85% da sua produção para mais de 100 países nos cinco continentes. Entre os principais compradores estão União Européia (48% do total), América do Norte (14%), Extremo Oriente (14%), Leste Europeu (12%), América Latina (6%) e, ainda, África e Oriente Médio (6%) (ANUÁRIO DO FUMO, 2007).

No Brasil, os tipos de fumo cultivados são classificados de acordo com a finalidade de uso e o método de cura. São eles os fumos tipo estufa, galpão, oriental e outros pequenos grupos. O processo de cura é muito importante para garantir ao produto aroma e boa qualidade química. Neste processo, a clorofila é degradada e os carboidratos são convertidos a açúcares simples. Os fumos do tipo estufa compreendem os grupos varietais Virgínia e Amarelinho. Possuem colheita de folhas individual e cura através de calor artificial em estufas apropriadas. São empregados para misturas na fabricação de cigarros industrializados e possuem alto teor de açúcares. Os do tipo galpão compreendem os grupos varietais Burley, Comum, Dark e Maryland. A colheita é feita pelo corte da planta inteira e a cura é realizada em galpões sem utilização de calor artificial. Estes grupos também são utilizados em misturas na fabricação de cigarros industrializados. Os fumos do tipo oriental compreendem os grupos varietais Izmir, Basma e Gavurkoy. Possuem folhas pequenas e característica marcante pelo forte aroma, razão pela qual são designados fumos tipo *flavor*, importantes na mistura para fabricação de cigarros industrializados devido ao aroma característico e baixos teores de nicotina (MASSOLA et al., 2005). O Brasil é o maior produtor mundial de fumos *flavor* e *semi-flavor*, utilizados em misturas para assegurar o

sabor e o aroma dos melhores cigarros, e nos últimos anos tem sido destaque em exportação (ANUÁRIO DO FUMO, 2007).

Outros grupos varietais como o charuto, utilizado na fabricação de charutos, o arapiraca, na fabricação de cigarrilhas e charutos e o tipo corda, são cultivados em menor escala no Brasil. Uma outra finalidade para o tabaco que tem se tornado realidade em alguns países é seu potencial uso medicinal, na produção de produtos biofarmacêuticos como vacinas, hormônios, anticorpos e insulina (BLINDER et al., 2007).

2.1.2 Tobacco mosaic virus e *Meloidogyne incognita*

As doenças do tabaco são de diversas etiologias. Atualmente, as viroses são os principais problemas da cultura. Dentre estas se destacam o mosaico do tabaco causado por TMV, além das viroses conhecidas como vira-cabeça, causada por *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), “streak”, causado por *Tobacco streak virus* (TSV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). No Brasil, o fumo também é muito afetado pelo ataque de nematóides (*Meloidogyne incognita*) e outras doenças de menor importância, como murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), canela preta (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) e outras (MASSOLA et al., 2005).

Em 1898, Martinus W. Beijerinck propôs o conceito "*contagium vivum fluidum*", para descrever o TMV após constatar que se tratava de partícula menor que uma bactéria e permanecia viável somente se mantida em plantas vivas (SCHOLTHOF, 2001a). Em 1946, Wendall Stanley recebeu o Prêmio Nobel pelo isolamento de cristais de TMV. Neste mesmo período, os pesquisadores F.C. Bawden e N. Pirie demonstraram que o TMV é uma ribonucleoproteína, composta de RNA e capa protéica (SCHOLTHOF, 2000b).

O TMV é uma partícula de RNA de aproximadamente 300 X 18 nm e pertence ao gênero *Tobamovirus*, da família *Bromoviridae*. O TMV tem distribuição mundial, sendo encontrado em todos os países onde o tabaco é cultivado. As estirpes de TMV são encontradas em aproximadamente 200 espécies de plantas, em sua maioria

solanáceas, sendo relatadas grandes perdas em tomate e pimenta (WHITHAM et al., 1996).

Estudos da estrutura e seqüência do TMV demonstraram a existência de quatro proteínas: duas delas são necessárias para o processo de replicação viral (126 kDa e 183 kDa), uma é necessária para a movimentação célula-célula (30 kDa) e outra para o processo de encapsidação viral (17,5 kDa). As replicases encontradas no gênero *Tobamovirus* interagem com proteínas do hospedeiro e afetam a replicação viral e o desenvolvimento de sintomas. As interações incluem a associação a proteínas de membrana do hospedeiro (YAMANAKA et al., 2000), reconhecimento pelo gene correspondente de resistência, o gene N, oriundo de *N.glutinosa* (WHITHAM et al., 1994), resposta de morte celular do hospedeiro (BILGIN et al., 2003), associação com ATPases e desencadeamento de reações que afetam a acumulação do vírus (ABBINK et al., 2002; PADMANABHAN et al., 2006).

O TMV é considerado o vírus de maior taxa de transmissão mecânica. A partícula viral permanece viável por muito tempo em restos culturais de plantas hospedeiras e sementes, se tornando a fonte de inóculo primário (MASSOLA et al., 2005). As infecções primárias são responsáveis por uma taxa menor que 10% do total de plantas infectadas no campo. Entretanto, as infecções secundárias ocasionadas pelo contato manual e de ferramentas dos produtores com as plantas doentes são responsáveis pela disseminação do patógeno. Outra importante fonte é a contaminação pelas mãos dos produtores que possuem o hábito de fumar cigarros.

Os sintomas variam de acordo com as estirpes do vírus e cultivares de fumo. Em geral, as plantas apresentam redução da área foliar, rugosidade e malformação das folhas. Os sintomas no limbo foliar são caracterizados por áreas verde-amareladas resultando em mosaico típico (SHEW; LUCAS, 1991). A redução na produção de plantas doentes é de aproximadamente 15%.

O manejo fitossanitário baseia-se na eliminação de restos culturais e nos cuidados na implantação e manejo da cultura. Na fase de implantação e produção de mudas, por exemplo, devem-se utilizar medidas sanitárias rigorosas para evitar a introdução do vírus em áreas indesejáveis. A desinfecção de instrumentos de poda ou rega, descarte de bandejas contaminadas e orientação aos produtores para não

manusearem cigarros, cigarrilhas, charutos ou qualquer outro produto oriundo de tabaco nas operações de capação, ou seja, na retirada do ponto de crescimento da planta e desbrota, são importantes medidas para evitar a transmissão do vírus. O escalonamento de operações com início em áreas novas e sadias também é prática recomendada. A transmissão por insetos não apresenta relevância epidemiológica (MASSOLA et al., 2005).

Outros patógenos importantes para a cultura do fumo são os nematóides do gênero *Meloidogyne*, como *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*. Dentre estes, o mais importante é o *Meloidogyne incognita*, uma vez que possui uma ampla variedade de hospedeiros de plantas daninhas e outras culturas, o que torna impossível sua erradicação. Sintomas de amarelecimento nas folhas, murcha e enfezamento da planta são denominados sintomas reflexo devido à redução da eficiência do sistema radicular. Quando ocorre em elevadas populações, pode destruir por completo as raízes que apresentam formação de galhas (MASSOLA et al., 2005).

O manejo fitossanitário da cultura para o controle deste patógeno preconiza o uso de mudas sadias para evitar a introdução de nematóides em novas áreas e a redução da população do parasita em áreas infectadas. Para isso, o melhor método é o de rotação de culturas com espécies que não permitam a multiplicação de nematóides e também culturas não hospedeiras ou repelentes, como o cravo-de-defunto, crotalária e nabo-forrageiro.

2.1.3 Resistência a TMV derivada de *N. glutinosa*

Nolla e Roque (1933) relataram a introdução da resistência a TMV em *N. tabacum* utilizando a variedade de tabaco colombiana 'Ambalema', possuidora de dois genes recessivos de resistência a TMV (BAGLEY, 2001). Allard (1914) relatou que *N. glutinosa* apresentava morte celular no ponto de infecção após a inoculação com TMV e não apresentava mosaico. Holmes (1929) observou os sintomas de setenta e sete espécies de *Nicotiana* após a inoculação com TMV, a maioria das espécies apresentou mosaico, porém, *N. rustica*, *N. langsdorffi*, *N. acuminata*, *N. sandera* e *N. glutinosa* apresentaram resposta de hipersensibilidade (RH). Os resultados deste

estudo demonstraram que *N. glutinosa* foi a espécie que apresentou uniformidade de RH em curto período, se tornando o modelo para quantificar a resistência a TMV (HOLMES, 1929 apud BAGLEY, 2001).

Holmes (1938) relatou que a resistência de *N. glutinosa* era controlada pelo gene dominante denominado N. Este gene possibilitou o progresso nos estudos para introdução de resistência em *N. tabacum*, pois a única fonte de resistência conhecida pertencia a cultivar Ambalema citada anteriormente, a qual demonstrou dificuldades na obtenção de híbridos resistentes devido ao caráter recessivo da resistência (VALLEAU, 1942) e produtividade insatisfatória. A resistência a TMV foi incorporada a *Nicotiana tabacum* L. utilizando-se a hibridização interespecífica entre *Nicotiana glutinosa* (n=24) e *Nicotiana tabacum* (n=48) pela espécie anfidiplóide *Nicotiana digluta* e repetidos retrocruzamentos, originando a cultivar Samsoun (HOLMES, 1938; MARATHE et al., 2002). A transferência do gene N para *N. tabacum* foi comprovada por estudos de análise citogenética. Desde então, a maioria das cultivares comerciais resistentes a TMV possuem este gene (BEEKWILDER, 1999; BAGLEY, 2002).

O gene N foi o primeiro gene de resistência de plantas a vírus a ser clonado (WHITHAM et al., 1994). Atualmente, é utilizado para a transformação de tabaco e tomate, *Lycopersicon esculentum* L. (WHITHAM et al., 1996).

2.1.4 O gene N

O produto do gene N interage com a replicase do TMV segundo o modelo clássico gene-a-gene descrito por Flor (1971) (WHITHAM et al., 1996). O gene N é dominante e confere resposta de hipersensibilidade, conforme descrito por F. O. Holmes (1938). A resposta de hipersensibilidade (RH), por sua vez, está relacionada a modificações celulares decorrentes de reações de espécies reativas de oxigênio, fosforilação de proteínas, fluxo de íons, produção de compostos antimicrobianos e expressão de genes de defesa (DIXON, et al. 2004). A morte de células aparentemente funciona como fator delimitante ao vírus, evitando sua proliferação além do sítio de infecção (ERICKSON et al., 1999).

Análises da sequência de cDNA do gene N demonstraram que o gene codifica uma proteína de aproximadamente 131,4 kDa. Sua sequência de aminoácidos apresenta três domínios: um deles é o domínio de adesão de nucleotídeos (*nucleotide-binding-site/NBS*), constituído de três motivos encontrados em proteínas como kinases e ATPases. O segundo domínio é uma região rica em leucina (*leucine rich region/LRR*), que contém quatro repetições imperfeitas em *tandem* de 26 sequências de aminoácidos, que provavelmente estão ligadas à interação proteína-proteína. O terceiro domínio é um terminal amino (TIR), que possui 55% de similaridade com *Toll protein* e 49% similaridade com *interleukin-1*, estas relatadas como participantes da interação proteína-proteína na via de transdução de sinais em insetos e animais, respectivamente (WHITHAM et al., 1994).

Para o melhoramento genético, a utilização de genes oriundos de espécies selvagens nem sempre é acompanhada de ganhos agrônômicos, uma vez que a introdução de genes utilizando hibridações e repetidos retrocruzamentos pode ocasionar o arraste gênico, ou seja, em conjunto com a introdução do gene de interesse podem ser incorporados outros genes a ele ligados geneticamente, de efeitos deletérios (BROWN, 2002). Estudos relatam a correlação do gene N, presente em algumas cultivares, e queda em produtividade em cultivares do tipo estufa (LEGG, 1979 apud LEWIS et al., 2007).

Um exemplo ilustrativo do efeito de arraste gênico é o estudo comparativo relatado por Lewis et al. (2007) foram comparados a variação de produção entre a cultivar suscetível K326, sem o gene N e a K326 após a introdução do gene N via hibridização interespecífica e retrocruzamentos e a K326 após a introdução do gene via transformação genética. Os resultados demonstraram perdas de produtividade entre a cultivar sem o gene N em relação a cultivar transformada pela via sexual provavelmente devido ao arraste gênico. Este fato não ocorreu na cultivar obtida via transformação genética, a cultivar K326 obteve melhora na produtividade. A transformação genética se revelou um método alternativo para a introdução de genes já que elimina eventuais problemas de arraste gênico devido a inserção apenas do gene (LEWIS et al., 2007). Porém, este método possui como pontos negativos à indução de modificações genéticas na cultura de tecidos como alterações na estrutura dos cromossomos,

deleções, mutações pontuais e modificações na metilação do DNA (KAEPPLE et al., 2000; JAN, 2001), além da variação somaclonal e resistência dos consumidores a produtos transgênicos (LEWIS et al., 2007).

2.1.5 Marcadores moleculares

Os métodos clássicos empregados no melhoramento de espécies autógamas seguem princípios de autofecundações sucessivas ou retrocruzamentos. São eles: seleção de linhas puras, introdução de germoplasma, seleção massal de plantas resistentes, métodos SSD (*single seed descendent*), método MSSD (*modified single seed descendent*), método de populações segregantes, método de retrocruzamentos e seleção recorrente (BORÉM; MIRANDA, 2005). Os métodos clássicos de melhoramento de desenvolvimento de cultivares resistentes a pragas e doenças são satisfatórios, porém lentos e laboriosos. A utilização de marcadores moleculares na seleção dos genótipos resistentes pode acelerar o melhoramento devido à redução de atividades como manutenção, isolamento e inoculação de pragas e patógenos e avaliação dos genótipos, as quais muitas vezes são de difícil mensuração. A redução destas atividades nas etapas iniciais e intermediárias do programa contribui para redução de custos do programa, sendo necessárias avaliações de campo com inoculações ou exposição da planta ao patógeno apenas nas etapas finais para confirmação da seleção de genótipos resistentes feita de maneira indireta pelo uso de marcadores (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Programas de melhoramento podem empregar diversos tipos de marcadores moleculares para o desenvolvimento das cultivares resistentes, como por exemplo polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), microssatélites e polimorfismo de restrição de fragmentos de DNA (RFLP). O uso de técnicas moleculares nos programas de melhoramento tem obtido ampla difusão, sendo o AFLP comumente utilizado em programas de melhoramento como em tomate, batata e também em tabaco (SALIBA-COLOMBANI et al., 2000; JULIO et al., 2006).

Marcadores AFLPs reúnem a especificidade da digestão com combinações de enzimas de restrição e detecção dos polimorfismos via reação polimerásica em cadeia (PCR). A grande vantagem deste processo é a de se obter de 50-100 fragmentos amplificados por reação (VOS et al., 1995). Outro processo descrito recentemente é o *Ligation mediated Polymerase Chain Reaction* (LM-PCR), um tipo de AFLP modificado que é usado para identificar marcadores moleculares ligados a genes de resistência que contêm regiões conservadas, como as regiões TIR, NBS e LRR discutidas anteriormente. A aplicação desta técnica em estudos em macieira resultou no mapeamento de novos marcadores moleculares similares a genes de resistência a *Venturia inaequalis* contendo a região NBS-LRR (CALENGE et al., 2005). Em alface foram identificados marcadores NBS-LRR ligados a potenciais genes de resistência (SYED et al., 2006). Mantovani et al. (2006) relataram o uso desta técnica para estudo da diversidade genética em trigo e a associação dos resultados obtidos com trabalhos futuros de mapeamento genético e/ou QTLs (*quantitative trait loci*) relacionados a genes de resistência.

Diante do grande número de informações advindo da clonagem e seqüenciamento de genes, o desenvolvimento de marcadores moleculares pode ser realizado baseando-se em informações disponíveis na literatura para desenvolvimento de marcadores perfeitos, ou seja, aqueles cujo desenvolvimento é feito com base na própria seqüência do gene de interesse. Podemos citar como exemplos, o desenvolvimento do marcador baseado no gene Sw-5 de tomate para resistência a *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), para o gene da betaína aldeído desidrogenase para seleção de genótipos aromáticos em arroz e para os genes *Rht-B1b* e *Rht-D1b* ligados a redução do tamanho de cultivares de trigo (GARLAND et al., 2005; BRADBURY et al., 2005; ELLIS et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

3.1.1 Populações segregantes para resistência a TMV

Populações F2 e retrocruzamento (RC1F1), segregantes para o gene N, foram obtidas através do cruzamento entre as cultivares Coker 176 (C176) e Kentucky 326 (K326). A primeira possui o gene N e, portanto, é resistente a TMV. A cultivar K326 possui excelente potencial produtivo, mas é suscetível a TMV. É oriunda de cruzamentos entre linhagens oriundas do cruzamento de Coker 179 e Coker 319 com McNair 225, McNair 30 e NC95 (MOORE et al., 1998; NORTH CAROLINA CROP IMPROVEMENT ASSOCIATION – NCCIA, 2008). Para a etapa de inoculação do TMV e avaliação dos sintomas, utilizaram-se os genitores resistente (C176) e suscetível (K326), população segregante F2 (C176 X K326) e de retrocruzamento ([C176 X K326] X K326). A etapa de genotipagem foi realizada com os marcadores moleculares candidatos e o genitor resistente (C176), genitor suscetível (K326) e população segregante F2 (C176 X K326). As populações segregantes foram produzidas no Centro de Melhoramento de Fumo na empresa Souza Cruz S.A. localizada em Rio Negro – Paraná.

3.1.2 Paineis de cultivares comerciais

Um painel de cultivares comerciais de tabaco foi avaliado para resistência a TMV (Tabela 1), com a finalidade de verificar se o fenótipo apresentado pelas cultivares com relação a resistência ao vírus corresponderá ao genótipo predito pelo marcador desenvolvido neste trabalho. Esta avaliação teve como objetivo validar o marcador molecular para uso em programas de melhoramento de tabaco assistido por marcadores.

Tabela 1 - Cultivares comerciais de tabaco utilizadas para validação do marcador molecular para o gene N de resistência a TMV

Tipo Virginia	Tipo Burley	Tipo Maryland	Tipo Comum	Tipo Oriental	Tipo Amarelinho
C176	Bag2513	CSC 500	Bravo 702	Mirodata	CSC 100
C371G	BanketA1	MD1	Correntino	Gavurkoy	CSC 102
CSC 4506	By21	MD2	CSC 302	Izmir	
K149	By11A	MD32	Guapo		
K326	By37	MD 608	Sauterno		
K358	GR136	MD609			
MN373	Ky14				
NC71	Ky26V				
NC95	Ky907				
NC729	L8				
RG08	TN86				
Spg96M	TN90				
Spg108LF	VA509				
VA156LF					

3.1.3 Populações segregantes F2 e retrocruzamento (RC1F1) para avaliação da resistência a *Meloidogyne incognita* raça 3

Populações F2 e retrocruzamento foram obtidas através dos cruzamentos entre as cultivares Coker 176 (C176) e Coker 371G (C371G). A primeira é resistente a *M.incognita* e oriunda do cruzamento entre Coker 258 e várias linhagens. A cultivar C371G é suscetível a *M.incognita* e oriunda de cruzamentos entre Speight G-28, NC82 e as linhagens 354, F-105 e 34 (MOORE et al., 1998; NCCIA, 2008). Para a etapa de inoculação do *M.incognita* raça 3 e avaliação dos sintomas, utilizaram-se os genitores resistente (C176) e suscetível (C371G), população segregante F2 (C176 X C371G) e de retrocruzamento ([C176 X C371 G] X C371G). As populações segregantes foram produzidas no Centro de Melhoramento de Fumo na empresa Souza Cruz S.A. localizada em Rio Negro – Paraná.

3.2 Avaliação da resistência a TMV

Para avaliação da resistência a TMV o inóculo foi preparado com uma estirpe de TMV mantida em plantas de fumo suscetíveis cultivadas em casa-de-vegetação. A suspensão do inóculo foi preparada a partir de maceração das folhas de fumo infectadas em solução tampão contendo Na_2HPO_4 (8,6 g/L) e Na_2SO_3 (5,0 g/L) com pH ajustado para 7,0 com solução KH_2HPO_4 (27,2 g/L). A inoculação foi realizada 20 dias após a semeadura, de maneira manual, através de leve raspagem das folhas pulverizadas com a solução de inóculo e o abrasivo *Carborundum*. Na avaliação das populações F2 e retrocruzamento foram utilizadas folhas destacadas acondicionadas em suportes de plástico com orifícios no fundo para imersão do pedúnculo da folha em água. Como testemunhas foram inoculados vinte indivíduos de cada genitor. Os sintomas foram avaliados três dias após a inoculação mediante inspeção visual.

Na avaliação da resistência das cultivares comerciais (Tabela 1) utilizou-se dez plantas de cada. As folhas foram inoculadas diretamente em plantas cultivadas em vaso. Os sintomas foram avaliados cinco e quinze dias após a inoculação mediante inspeção visual de sintomas. Na avaliação dos sintomas foi avaliada a presença de sintomas de hipersensibilidade nos indivíduos resistentes e ausência de sintomas nos indivíduos suscetíveis.

Para confirmação da identidade da estirpe de TMV utilizada como inóculo neste ensaio, iniciadores degenerados foram desenvolvidos com base no alinhamento múltiplo de dez seqüências do TMV disponíveis no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). O alinhamento das seqüências do TMV foi realizado no programa Multialign (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multialin/multialin.html>) e o desenvolvimento dos iniciadores foram realizados utilizando-se o programa Primer3 (ROIZEN; SKALETSKY, 2000). Os iniciadores (TMV-F: ATGKCTTACACNRTHCNAVT e TMV-R: HKHAGGAGTNGTAGHCCADC) foram utilizados em PCR utilizando-se como molde o cDNA oriundo do RT-PCR (Superscript III First Strand Synthesis – Invitrogen) de amostras do RNA total extraído de plantas correspondentes aos genitores resistente e suscetível e planta de tabaco sadia. Como controle foi utilizado uma estirpe purificada

de TMV cedida pelo Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende (Laboratório de Virologia Vegetal - ESALQ/USP).

3.3 Avaliação da herança da resistência a raça 3 de *M.incognita*

Para o ensaio de resistência a *M.incognita* foram avaliadas 141 plantas da população F2 [C176 X C371G] e 137 plantas da população RC1F1 ([C176 X C371G] X C371G). Como inóculo, foram utilizados nematóides mantidos em plantas de tomate suscetível cultivadas em casa-de-vegetação. Os espécimes foram previamente identificados como pertencentes à raça 3, pela Dra. Andressa Zamboni Machado com base nas reações do teste de hospedeiros diferenciadores (TAYLOR; SASSER, 1978 apud FREITAS et al., 2007) e mantidos em casa-de-vegetação. O inóculo foi obtido pela trituração das raízes em liquidificador em baixa rotação por 1 minuto, e a filtragem da suspensão em peneira de 0,150mm de abertura de malha (60 mesh) acoplada a outra de 0,025mm (500 mesh). O conteúdo da peneira de 500 mesh foi coletado em tubo de centrifuga, acrescentando-se caolim, e foi centrifugado a 1.800 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se uma solução de sacarose (400 g de açúcar em 750 ml de água), sendo processada uma centrifugação por 1 min a 1.800 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em peneira de 500 mesh, para lavagem dos nematóides com água e retirada da sacarose, sendo o conteúdo da peneira coletado em béquer. Os ovos e nematóides extraídos foram contados com auxílio de lâmina de Peters em microscópio óptico e a suspensão final foi calibrada para 5.000 ovos + juvenis (J2) por mililitro. Foram feitas duas inoculações, uma aos 10 dias e outra aos 50 dias do transplante, sendo inoculado 1 ml da suspensão do inóculo em um orifício no substrato localizado próximo ao colo das plantas. A inoculação também foi realizada em 20 indivíduos de cada linhagem parental como testemunha. A avaliação foi realizada aos 60 dias após a segunda inoculação, através da observação da presença/ausência de galhas nas raízes.

3.4 Desenvolvimento de marcador molecular para o gene N

3.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através do maceramento de aproximadamente 0,3 g de folhas em tubos de 1,5 mL com 300µl da solução de extração CTAB (0,7M NaCl, 10% CTAB, 50mM tris pH 8,0, 10mM EDTA) seguido de agitação. Em seguida foi acrescentado 400µl da solução de extração CTAB (0,7M NaCl, 10%CTAB, 50mM tris pH 8,0, 10mM EDTA, 0,1% 2-mercaptoetanol). Posteriormente, os tubos foram incubados por 30 minutos a 55°C.

Após 30 minutos foram adicionados 500µl de solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1, e a emulsão resultante foi agitada vagarosamente por 20 vezes. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi recuperado em volume de 550µl em novo tubo contendo 50µl de tampão de extração CTAB 10% e adicionado 600µl de solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. A solução foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram acrescentados 500µl de 2-Propanol a 15°C, incubado a -20 °C por 30 minutos e centrifugado por 5 minutos a 13 000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 350µl de etanol 70% a 13 000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o DNA foi seco a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora, ressuspendido em 30µl solução TE (10mMTris e 1mM EDTA) adicionada de Rnase (Invitrogen) na concentração de 10µg/ml e incubado por 1 hora a 37°C. A verificação da quantidade e integridade do DNA foi realizada após eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) adicionado de 0,5% Sybr Safe (Invitrogen), nas condições de 3V/cm por 1 hora a 25°C em tampão TBE 0,5X (2,7g tris base, 1,375g ácido bórico e 0,232 g EDTA q.s.p 1 litro).

3.4.2 Desenvolvimento do marcador para o gene N e genotipagem

Com base na seqüência do gene N depositada no Genbank (Nº acesso U15605) (WHITHAM, et al. 1994), iniciadores específicos foram desenvolvidos para as regiões conservadas TIR, NBS e LRR (Tabela 2), utilizando o programa computacional Primer3 (ROIZEN; SKALETSKY, 2000). Estes iniciadores foram utilizados na genotipagem dos genitores C176 e K326 e dos indivíduos da população segregante F2 (C176 X K326).

Figura 1 - Esquema do posicionamento dos iniciadores desenvolvidos para o gene N

Tabela 2 - Seqüências dos iniciadores utilizados para desenvolvimento de marcador para o gene N

Oligonucleotídeos	Seqüências	Temperatura de anelamento
TIR-F	5'-ATGCGATCTTCTTCTTCTTCTTAGATGG- 3'	49°C
TIR-R	5'-TGATCTCTATCCTTAGTTACCACAAGCC-3'	49°C
NBS-F	5'-CGAAGAAGGTCCTAATTGTGCTTGATG-3'	50°C
NBS-R	5'-ATGCATTTAAGTCATGCATTTGAACCTG-3'	50°C
LRR-F	5'-GGACCATGGCAATGGAAGCAATTT-3'	53°C
LRR-R	5'-GTGTGCATCATCAAGTTTCACTCTATG -3'	53°C

Para avaliação dos genitores (C176 e K326), população segregante F2 (C176 X K326) e cultivares comerciais (Tabela1) para resistência a TMV foram utilizados na reação de PCR, iniciadores específicos para o gene N conforme descrito anteriormente (Tabela 2).

As reações foram realizadas em volume final de 25 µl contendo 1X PCR Buffer (Invitrogen), 2,0 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,2mM dNTPs (Invitrogen), 0,1µM de cada iniciador, 1 unidade de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e aproximadamente 30 ng de DNA. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700.

O programa utilizado foi de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 49°C (TIR-F/R), 50°C (NBS-F/R) ou 53°C (LRR-F/R) por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e extensão final de 72°C por 5 minutos. A visualização do produto amplificado foi realizada após eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) adicionado de 0,5% Sybr Safe (Invitrogen), nas condições de 3V/cm por 1 hora a 25°C em tampão TBE 0,5X (2,7g tris base, 1,375g ácido bórico e 0,232 g EDTA q.s.p 1 litro).

3.5 Análise de ligação entre marcador molecular e gene de resistência

As proporções de indivíduos resistentes e suscetíveis nas populações F2 e RC1F1 foram comparadas às aquelas esperadas no caso de segregação monogênica dominante para resistência através do teste de qui-quadrado (χ^2). A segregação entre gene de resistência e marcador foi realizada admitindo-se segregação independente entre gene e marcador como hipótese nula e a ligação entre ambos como hipótese alternativa. A distância entre gene e marcador foi estimada com base na porcentagem de recombinantes obtida pela comparação dos resultados obtidos na fenotipagem e genotipagem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Tobacco mosaic virus*

4.1.1 Avaliação das populações segregantes RC1F1 e F2 para resistência a TMV

A identidade do inóculo foi confirmada através da amplificação de um fragmento da capa protéica do TMV utilizando-se os iniciadores TMV-F e TMV- R (item 3.2) em reação de PCR utilizando-se como molde o cDNA obtido através da extração de RNA total das amostras. O resultado da reação de PCR correspondente a planta sadia, genitores resistente, genitor suscetível e controle positivo permitiu a detecção do TMV no genitor suscetível e controle positivo (Figura 2).

Figura 2 - Eletroforese em gel de Agarose 1.5% (4V/cm por 3 horas a 25°C). Amostras: M – Marcador 1 kb Plus ladder™-(Invitrogen), 1 – Planta sadia, 2- Genitor resistente, 3- Genitor suscetível e 4 - Controle positivo.

A avaliação visual dos sintomas permitiu distinção entre indivíduos resistentes e suscetíveis, uma vez que os indivíduos resistentes apresentaram sintomas intensos de hipersensibilidade (Figuras 3 e 4). A visualização de sintomas em indivíduos suscetíveis não foi possível devido ao curto período entre a inoculação e avaliação de sintomas (Figura 4). Ressalta-se que estes sintomas intensos de hipersensibilidade apresentados nas figuras 3 e 4 resultam de inoculação mecânica e grande quantidade de inóculo. Em condições naturais, é comum encontrar sintomas em menor intensidade. Os sintomas apresentados neste ensaio foram semelhantes aos relatos nos inúmeros trabalhos realizados com TMV em tabaco. Whitham et al. (1994) relata como resposta típica de

defesa a reação de hipersensibilidade e morte celular no sítio de infecção do patógeno em indivíduos resistentes a TMV. A reação de hipersensibilidade e o desenvolvimento de mosaico é a resposta comum do hospedeiro a infecção de vírus, como por exemplo, a reação de hipersensibilidade em *Nicotiana edwardsonii* após a inoculação com *Cauliflower mosaic virus* estirpe W260 e o desenvolvimento de mosaico após a inoculação com a estirpe D4 (PALANICHELVAM et al., 2000).

Figura 3 - Reações das linhagens parentais ao TMV. À esquerda C176 (resistente e direita K326 (suscetível)

Figura 4 - Reações apresentadas pelos indivíduos resistente com sintomas de hipersensibilidade (A) e suscetível (B) após a inoculação com TMV

Com base nos resultados da fenotipagem (Tabela 6; Anexo), a proporção entre o número de plantas resistentes e suscetíveis (154:46) da população F2 e teste χ^2 (Tabela 3), observando-se os graus de liberdade neste caso igual a 1 e os limites de significância tabelados $P > 0,05$ e $P > 0,01$ iguais a 3,84 e 6,64, respectivamente, conclui-se que os resultados confirmam o caráter monogênico e dominância completa para a resistência a TMV.

Tabela 3 - Resultados da avaliação de resistência da população segregante F2 a TMV e teste de χ^2

Fenótipos	Freq.observada	Freq.esperada	χ^2 ($\alpha= 1\%$)
Resistentes	154	150	0,426 ^{ns}
Suscetíveis	46	50	

4.1.2 Avaliação da resistência de cultivares comerciais de tabaco a TMV

Na avaliação visual dos sintomas foi possível a distinção de indivíduos resistentes e suscetíveis (Figuras 5 e 6) devido a sintomas intensos de hipersensibilidade apresentados por indivíduos resistentes e desenvolvimento de mosaico nos indivíduos suscetíveis (WHITHAM et al., 1996), conforme mencionado anteriormente. Neste caso, no entanto, a visualização de sintomas em indivíduos suscetíveis foi possível devido à extensão do período de avaliação de quinze a vinte dias após a inoculação. Os resultados de fenotipagem das cultivares (Tabela 4) confirmaram não haver diferenças de reação de resistência entre este ensaio e informações disponíveis das cultivares.

As informações da resistência das cultivares CSC 4506, BAG 2513, CSC 500, CSC 32 e CSC 102 foram fornecidas pela empresa Souza Cruz S.A. A resistência a TMV da cultivar By 21 foi descrita por Chaplin e Mann (1978), as informações das cultivares C176, VA 156LF, Banket A1, Ky14, Ky26V, Ky907, L8 e TN 90 se encontram disponíveis em levantamentos realizados pelas empresas que as desenvolveram sendo disponibilizadas nos sites das universidades americanas da Carolina do Norte (NCCIA, 2008), Virgínia (VIRGINIA STATE UNIVERSITY, 2008) e Kentucky (UNIVERSITY OF KENTUCKY- UK, 2008). As informações das demais cultivares suscetíveis se encontram nestes sites acima citados.

Tabela 4 – Resultados da fenotipagem de cultivares para resistência a TMV

Tipo Virginia	Fenótipo	Tipo Burley	Fenótipo	Tipo Oriental	Fenótipo
C176	Resistente	Bag2513	Resistente	Mirodata	Suscetível
C371G	Suscetível	BanketA1	Resistente	Gavurkoy	Suscetível
CSC 4506	Resistente	By21	Resistente	Izmir	Suscetível
K149	Suscetível	By11A	Suscetível		
K326	Suscetível	By37	Suscetível		
K358	Suscetível	GR136	Suscetível		
MN373	Suscetível	Ky14	Resistente		
NC71	Suscetível	Ky26V	Resistente		
NC95	Suscetível	Ky907	Resistente		
NC729	Suscetível	L8	Resistente		
RG08	Suscetível	TN86	Suscetível		
Spg96M	Suscetível	TN90	Resistente		
Spg108LF	Suscetível	VA509	Suscetível		
VA156LF	Resistente				
Tipo Maryland	Fenótipo	Tipo Comum	Fenótipo	Tipo Amarelinho	Fenótipo
CSC 500	Resistente	Bravo 702	Suscetível	CSC 100	Suscetível
MD1	Resistente	Correntino	Suscetível	CSC 102	Resistente
MD2	Suscetível	CSC 302	Resistente		
MD32	Suscetível	Guapo	Suscetível		
MD 608	Suscetível	Sauterno	Suscetível		
MD609	Suscetível

Figura 5 - Sintomas de hipersensibilidade apresentados pelos indivíduos resistentes após a inoculação com TMV. 1- BAG2513; 2-Banket A1; 3- BY21; 4- C176; 5- CSC102; 6- CSC302; 7- CSC500; 8- CSC4506; 9- KY14; 10 - KY26V; 11- KY907; 12 - L8; 13 - MD1; 14- TN90 e 15- VA156LF

Figura 6 - Reações apresentadas pelos indivíduos suscetíveis com sintomas de mosaico. 1- Bravo 702; 2 - BY37; 3- BY11A; 4- Correntino; 5- CSC100; 6- Gavurkoy; 7-GR136, 8- Guapo; 9- Izmir; 10- K149; 11- K326; 12- K358; 13- C371g; 14- MD2; 15- MD32; 16- MD608; 17- MD609, 18- Mirodata; 19- MN373; 20- NC71; 21- NC95; 22- NC729; 23- RG08; 24- Sauterno; 25- Spg28; 26- Spg96m; 27- Spg108LF; 28- TN86 e 29- VA509

4.1.3 Genotipagem da população F2 utilizando marcador para o gene N

A genotipagem dos genitores foi realizada com os iniciadores desenvolvidos para as regiões conservadas do gene N: TIR-F/R, NBS-F/R e LRR-F/LRR-R (Tabela 2) conforme descrito no item 3.4.3. Os iniciadores TIR-F/R e NBS-F/R não apresentaram fragmentos polimórficos entre os genitores resistente e suscetível. Entretanto, o produto amplificado obtido com os iniciadores LRR-R/LRR-F apresentou um fragmento polimórfico de aproximadamente 1,8 kb presente no genitor resistente e ausente no suscetível (Figura 7). Estes iniciadores foram utilizados na genotipagem de 200 indivíduos da população segregante F2 (C176 X K326) (Figura 8, Tabela 6 - Anexo).

O fragmento polimórfico apresentado diferenciou os indivíduos resistentes e suscetíveis, porém, não se apresentou como marcador co-dominante, já que o híbrido (F1) apresentou um fragmento idêntico ao genitor resistente (aproximadamente 1,8 kb) e outro fragmento idêntico ao genitor suscetível (aproximadamente 1,5 kb) (Figura 7).

A hipótese é que este fragmento polimórfico (1,8 kb) represente uma cópia do gene N existente apenas nos indivíduos resistentes oriunda de *N. glutinosa*. E o fragmento amplificado comum a todos os indivíduos (1,5 kb) corresponda a uma cópia de regiões homólogas a região LRR de genes de resistência. Este fato pode ser comprovado pelos relatos da detecção de regiões homólogas a genes de resistência em tabaco. Por exemplo, Angel et al. (2006) relatou o uso de iniciadores degenerados para detecção de setenta e sete seqüências homólogas de regiões conservadas (NBS) em *N. glutinosa*. Em batata foram detectadas duas seqüências homologas (NI-25 e NI-27) a regiões conservadas do gene N que conferem resistência a *Synchytrium endobioticum*, agente causal do cancro da batata (HEHL et al., 1999). Vidal et al. (2002) relataram que o gene *Y-1* de resistência a *Potato virus Y* em batata que corresponde a classe de proteínas TIR-NBS-LRR possui homologia ao gene N.

Figura 7 - Eletroforese em gel de Agarose 1.5% (4V/cm por 4 horas a 25°C). Amostras M- Marcado 1 kb Plus ladder™-(Invitrogen), R- Genitor C176, S- Genitor K326 e F1 – (C176 X K326)

Figura 8 - Eletroforese em gel de Agarose 1.5% (3V/cm por 4 horas a 25°C). Amostras da população segregante F2 e M - Marcador 1 kb Plus ladder™-(Invitrogen).

4.1.4 Análise da ligação entre o marcador candidato e o gene N

O número de recombinantes, ou seja, o número de indivíduos resistentes apresentando o fragmento amplificado idêntico ao suscetível e indivíduo suscetível com a banda idêntica ao resistente foi igual a um, em ambos os casos (Figura 10).

Figura 10 – Esquema ilustrativo dos recombinantes. M- Marcador molecular, 1 – Genitor resistente, 2- Genitor suscetível, 3 – Indivíduo recombinante de genótipo resistente e fenótipo suscetível e 4 - Indivíduo recombinante de genótipo suscetível e fenótipo resistente

O evento de recombinação, no qual o indivíduo recombinante apresentou o fragmento amplificado suscetível e fenótipo resistente, não deveria ocorrer já que os iniciadores utilizados são baseados em parte da seqüência do gene de resistência. Eventos de recombinação no interior de genes de resistência são eventos raros, porém, podem acontecer devido a formação de cluster gênicos. Whitham et al. (1994) demonstraram a presença de uma família de genes semelhantes ao gene N no gênero *Nicotiana*. Estes genes estão fisicamente próximos ao locus do gene N formando um cluster gênico. A formação de cluster gênico poderia ocasionar instabilidade do locus do gene N e eventual pareamento desigual promovendo recombinações.

No caso do indivíduo recombinante, que apresentou o fragmento amplificado e ausência de sintomas de hipersensibilidade pode ser objeto dos eventos de recombinação acima citados, entretanto, não pode se descartar a hipótese do escape no momento da fenotipagem ou falha na inoculação do TMV, pois neste ensaio não foi possível a observação do desenvolvimento de sintomas nos indivíduos suscetíveis já que o experimento foi realizado com folhas destacadas. Outra hipótese é a de troca de identidade de plantas no momento da coleta de material vegetal, extração ou manuseio do DNA.

O clássico mecanismo de defesa gene-a-gene (FLOR, 1971) que segue o reconhecimento do patógeno pela planta tem sido modificado com a evolução dos patógenos devido a perda ou alteração dos genes Avr, da mesma forma, as plantas necessitam gerar novos meios de resistência. Em análises de seqüência de genes de resistência, as alterações e recombinações contribuem para geração de variantes com novos mecanismos de defesa (SMITH; HULBERT, 2005).

No estudo do gene de resistência (*Cf-9*) a *Cladosporium fulvum* em tomate foi identificado um evento de recombinação intragênica no cluster gênico no qual o gene *Cf-9* é o terceiro gene dentre cinco homólogos denominados *Hcr9-9A-9E*. Apesar de diferenças na seqüência de nucleotídeos entre *Hcr9* e *Cf-9*, este gene é constituído de regiões conservadas de seu antecessor sendo preservada a região de reconhecimento Avr9 não havendo diferença na resposta do hospedeiro (VAN DER HOORN et al., 2001). De maneira semelhante ao gene N (*N.tabacum*), a introdução deste *locus* em tomate (*Lycopersicon esculentum*) ocorreu pelo cruzamento com a espécie selvagem *Lycopersicon pimpinellifolium* (VAN DER HOORN et al., 2001).

Em milho um estudo indicou a presença de quatro variantes do gene *Rp1* de resistência à ferrugem. Os quatro variantes são oriundos de *crossing-overs* no cluster de genes *Rp1* e originaram diferenças de resistência raça-específica (SMITH; HULBERT, 2005). Lewis et al. (2005) relataram a existência de duas cópias do gene N inseridas em diferentes cromossomos em alguns acessos de *N. tabacum*, possibilitando eventos de recombinação. Em adição, o gene N incorporado ao genoma de *N. tabacum* carregou regiões oriundas do genoma de *N. glutinosa*, estas regiões são passíveis de eventos de recombinação (YOUNG; TANKSLEY, 1989).

Com base na comparação dos dados de fenotipagem e genotipagem infere-se que o marcador e o gene N estão proximamente ligados segundo taxa de recombinação, que foi de 1%, podendo-se inferir que a distância entre gene e marcador é de 1cM. Este é o primeiro relato de um marcador baseado na sequência do gene N em tabaco. Marcadores moleculares deste tipo podem ser utilizados em programas de melhoramento para seleção de genótipos com a vantagem de serem eficientes, rápidos e de baixo custo se comparado à seleção convencional.

4.1.5 Validação do marcador em cultivares comerciais

A genotipagem das cultivares de tabaco utilizando os iniciadores LRR-F e LRR-R (Figura 9) corresponde ao resultado obtido pela fenotipagem (item 4.1.2), ou seja, o sintoma apresentado após a inoculação com o vírus é idêntico ao esperado com base no marcador. As cultivares resistentes com sintomas de hipersensibilidade apresentam os fragmentos amplificados de tamanho aproximado 1,8 kb e 1,5 kb e as cultivares suscetíveis apresentam o fragmento amplificado de 1,5 kb, conforme descrito anteriormente no item 4.1.3. Portanto, o uso deste marcador foi viável na diferenciação dos genótipos resistentes e suscetíveis a TMV das cultivares comerciais (Tabela 4) utilizadas neste trabalho. Com base nesse resultado podemos sugerir o uso deste marcador para seleção de genótipos resistentes em cruzamentos nos quais estas cultivares sejam utilizadas.

O uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento tem como objetivo acelerar o processo de seleção de genótipos resistentes devido à eliminação de etapas de inoculações, seleções e diminuir as variações biológicas, como patogenicidade do inóculo, condições ambientais ideais, plantio adequado e ocorrência de outras doenças ou insetos, resultando eficiência na seleção e diminuição dos custos (ALZATE-MARIN et al., 2005).

O sucesso no uso de marcadores em programas de melhoramento pode ser constatado, por exemplo, em cevada tem sido eficiente na seleção de genótipos resistentes a *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) (BAUER et al., 1997). Outros relatos do uso de marcadores em importantes culturas comerciais podem ser verificados na

análise da resistência a *Phytophthora sojae* em soja (GORDON et al., 2007), na seleção de genótipos superiores na produção de óleo em canola (SNOWDON; FRIEDT, 2004), para melhoria da qualidade da fibra em algodão (GUO et al., 2003) e para resistência a míldio em girassol (BRAHM et al., 2000).

Nesse contexto, o uso do marcador molecular ligado ao gene N possui aplicação prática para o melhoramento do tabaco, auxiliando na seleção de genótipos resistentes a TMV.

Figura 9 - Eletroforese em gel de Agarose 1.5% (3V/cm por 4 horas a 25°C). M - Marcador 1 kb Plus ladder™- Invitrogen®. Amostras: 1- C176, 2- CSC 4506, 3- Ky149, 4- K326, 5- C371G, 6- MN 373, 7- NC71, 8- NC729, 9- NC95, 10- Rg08, 11- Spg28, 12- Spg108LF, 13- Spg96M, 14- VA156, 15- K358, 16- By21, 17- BAG 2513, 18- Banket A1, 19- By11A, 20- By37, 21- GR136, 22- TN90, 23- Ky26, 24- Ky907, 25- L8, 26- TN86, 27- Ky 14, 28- VA509, 29- Mirodata, 30- Gavurkoy, 31- Izmir, 32- CSC500, 33- MD1, 34- MD2, 35- MD32, 36- MD608, 37- MD 609, 38- Bravo 702, 39- Correntino, 40- CSC 302, 41- Guapo, 42- Sauterno, 43- CSC100, 44- CSC102

5 *Meloidogyne incognita*

5.1 Avaliação da resistência a *M.incognita* das populações segregantes RC1F1 e F2

Após 60 dias da segunda inoculação, o substrato contido nas raízes foi removido sendo observado a presença ou ausência de galhas nas raízes. Os sintomas foram facilmente identificados devido a presença de um grande número de galhas nos indivíduos suscetíveis e ausência nos resistentes (Figuras 11 e 12). A formação de galhas se dá devido ao hábito de parasitismo obrigatório do *M.incognita*, que vive aproximadamente todo seu ciclo de vida obtendo nutrientes a partir do citoplasma das células vivas das raízes, modificando-as drasticamente (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996). O estágio infectivo (J2) penetra nas raízes e migra até atingir o tecido vascular. Nesta fase iniciam-se modificações morfológicas nas células do hospedeiro originando a galha. O período compreendido entre a penetração até a formação das galhas pode variar de 3-6 semanas dependendo da espécie e condições ambientais (WILLIAMSON, 1999).

Os sintomas encontrados neste ensaio foram semelhantes ao descrito em alguns genótipos de milho que apresentam alta suscetibilidade a *M.incognita* (LORDELLO et al., 1998; SILVA et al., 2001). Em solanáceas, a formação de galhas e queda de produtividade foi apresentada por alguns genótipos de tomate e pimenta (VOS et al., 1998; SOUZA-SOBRINHO et al., 2002; ROBERTSON et al., 2006).

A fenotipagem da população segregante F2 (Tabela 7; Anexo) resultou em 102 plantas resistentes e 39 suscetíveis e teste χ^2 igual a 0,53 (Tabela 5). Os resultados da população de RC1F1 ([C176 X C371G] X C371G) (Tabela 8; Anexo) indicaram 67 plantas resistentes e 71 plantas suscetíveis e teste χ^2 igual a 0,1159 (Tabela 6). A proporção de 3:1 apresentada na população F2 e de 1:1 na população RC1F1 indicam que a resistência a *M.incognita* é monogênica e de dominância completa.

Estudos de análise da herança de resistência a nematóides são descritos na literatura com resultados semelhantes ao deste ensaio. A avaliação da resistência a *Globodera tabacum solanacearum* na cultivar C371G (*N. tabacum*) indicou resistência monogênica dominante (CROWDERA et al., 2003). Ng'ambi et al. (1999) relataram em

estudo de resistência a *Meloidogyne* em populações segregantes e retrocruzamentos oriundas de *N.tabacum* cv. Speight G-28 e linhagens 81-RL-2K e SA 1214, que a resistência a *M. arenaria* raça 1 e a *M. incognita* raça 1 e 3 podem ser controladas pelo mesmo gene de resistência monogênica.

Figura 11 - Sintomas apresentados pelos parentais C371G (suscetível - A) e C176 (resistente - B)

Figura 12 - Sintomas apresentados por indivíduos da população segregante F2 suscetíveis (A) resistentes (B)

Tabela 5 - Resultados da avaliação de resistência da população segregante F2 a *M.incognita* e teste de χ^2

Fenótipos	Freq.observada	Freq.esperada	χ^2 ($\alpha= 1\%$)
Resistentes	102	105,75	0,5318 ^{ns}
Suscetíveis	39	35,25	

Tabela 6 - Resultados da avaliação de resistência da população segregante RC1F1 a *M.incognita* e teste de χ^2

Fenótipos	Freq.observada	Freq.esperada	χ^2 ($\alpha= 1\%$)
Resistentes	67	69	0,1159 ^{ns}
Suscetíveis	71	69	

6 CONCLUSÕES

1 – O desenvolvimento de iniciadores baseado em informações e na seqüência e genes de resistência é uma alternativa viável para criação de marcadores moleculares para resistência a doenças

2 – Os fragmentos amplificados pelos iniciadores LRR-F e LRR-R estão ligados ao gene de resistência a TMV.

3- Os iniciadores LRR-F e LRR-R podem ser utilizados em programas de melhoramento devido sua proximidade ao gene N.

4 – A herança da resistência a *M. incognita* raça 3 da população F2 e de RC1F1 oriunda do cruzamento (C176 X C371G) possui caráter monogênico e dominância completa.

REFERÊNCIAS

ABBINK, T.E.; PEART, J.R.; MOS, T.N.; BAULCOMBE, D.C.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J. Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. **Virology**, New York, v. 295, p. 307-319. 2002.

ANGEL, C.A.; BALAJI, B.; CAWLY, J.D.; WIGGINS, B.E.; SCHOELZ, J.E. Characterization of the diversity in the N family resistance genes **Phytopathology**, Palo Alto, v.96, n.6 suppl., p. S5-S6, 2006.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 30, p. 333-342, 2005.

ANUÁRIO DO FUMO 2007. Disponível em:
<[http:// www.anuarios.com.br/port/anuarios.php](http://www.anuarios.com.br/port/anuarios.php)>. Acesso em: 20 set. 2007.

ASSOCIAÇÃO DOS FUMICULTORES DO BRASIL. Disponível em:
<<http://www.afubra.com.br>>. Acesso em: 20 maio 2008.

BAGLEY, C.A. **Controlling tobacco mosaic virus in tobacco through resistance**. 2001. 74 p. Dissertation (Master Science) – Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 2001.

BAUER, E.; WEYEN, J.; SCHIEMANN, A.; GRANER, A.; ORDON, F. Molecular mapping of novel resistance genes against *Barley mild mosaic virus* (BaMMV). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, n. 8, p. 1263-1269, 2005.

BEEKWILDER, K.M. **The inheritance of resistance to tobacco mosaic virus in tobacco introductions**. 1999. 53 p. Dissertation (Master Science) - Faculty Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1999. Disponível em:
<<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-041599-212828/>>. Acesso em: 28 maio 2008.

BILGIN, D. D.; LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P. P58(IPK), a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. **Developmental Cell**, Cambridge, n. 4, p. 651-661, 2003.

BINDLER, G; VAN DER HOEVEN, R.; GUNDUZ, I.; PLIESKE, J.; GANA, M.; ROSSI, L.; GADANI, F.; DONINI, P. A microsatellite marker based linkage map of tobacco. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, p. 341-349, 2007.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2005. 552 p.

BRADBURY, L.M.T.; HENRY, R.J.; JIN, Q.G.; REINKE, R.F.; WATERS, D.L.E. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 16, p. 279–283, 2005.

BRAHM, L.; ROCHER, T.; FRIEDT, W. PCR - based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew. **Crop Science**, Madison, v.40, p.676–682. 2000.

BROWN, J.K.M. Yield penalties of disease resistance in crops. **Current Opinion Plant Biology**, Oxford, v. 5, p. 339-344, 2002.

CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN DE WEG, E., SCHOUTEN, H.J.; VAN ARKEL, G.; DENANCÉ, C.; DUREL, C.E. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, p. 660-668, 2005.

CHAPLIN, J.F.; MANN, T.J. Evaluation of tobacco mosaic resistance factor transferred from burley to flue-cured tobacco **The Journal of Heredity**, Oxford, v. 69, n. 3, p. 175-178, 1978.

CROWDERA, B.J.; WILKINSON, A.C.A.; JOHNSON, C.S.; EISENBACH, J.D. Inheritance of resistance to tobacco cyst nematode in flue-cured tobacco. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1305-1312, 2003.

DIXON, M.S.; JONES, D.A.; KEDDIE, J.S.; THOMAS, C.M.; HARRISON, K.; JONES, J.D. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. **Cell**, London, v. 84, p. 451-459, 2004.

ELLIS, H.; SPIELMEYER W.; GALE, R.; REBETZKE, J.; RICHARDS, A. "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 105, n. 6/7, p. 1038-1042, 2002.

ERICKSON, F.L; DINESH-KUMAR, S.P.; HOLZBERG, S.; USTACH, C.V.; DUTTON, M.; HANDLEY, V.; CORR, C.; BAKER, B.J. Interactions between tobacco mosaic virus and tobacco N gene. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 354, p. 653-658, 1999.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. New York: McGraw–Hill, 1987. v. 1, 536 p.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275–276, 1971.

FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.D.L.O. Métodos em Nematologia Vegetal. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. eds. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa. UFV, 2007. 252-291.

GARLAND, S.; SHARMAN, M.; PERSLEY, D.M.; MCGRATH, D.J. The development of an improved PCR-based marker system for *Sw-5* an important TSWV resistance gene of tomato. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 56. p. 285-289, 2005.

GORDON, S. G.; KOWITWANICH, K.; PIPATPONGPINYO, W.; S. MARTIN, K. ST.; DORRANCE, A. E. Molecular Marker Analysis of Soybean Plant Introductions with Resistance to *Phytophthora sojae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n.1, p.113-118. 2007.

GUO, W.; ZHANG, T.; SHEN, X.; YU, J.Z.; KOHEL R.J. Development of SCAR Marker Linked to a Major QTL for High Fiber Strength and Its Usage in Molecular-Marker Assisted Selection in Upland Cotton. **Crop Science**, Madison, v. 3, p. 2252–2256. 2003.

HEHL, R.; FAURIE, E.; HESSELBACH, J.; SALAMINI, F.; WHITHAM, S.; BAKER, B.; GEBHARDT, D.C. TMV resistance gene N homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, n. 3-4, p.379-386. 1999.

HOLMES, F.O. Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 28, p. 553-561, 1938.

JAN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, Wageningen, v.118, n. 2, p. 153-166, 2001.

JULIO, E.; VERRIER, J.L.; DORLHAC DE BORNE, F. Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, p. 335-346, 2006.

KAEPPLER, S.M.; KAEPPLER, H.F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, n. 2/3, p. 179-188, 2000

LEWIS, R.S.; MILLA, S.R.; LEVIN, J.S. Molecular and genetic characterization of *Nicotiana glutinosa* L. chromosome segments in tobacco mosaic virus-resistente accessions. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 2355-2362, 2005.

LEWIS, R.S.; LINGER, L.R.; WOLFF, M.F.; WERNSMAN, E.A. The negative influence of N- mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 115, p. 169-178, 2007.

LORDELO, R.R.A. Herança da resistência de milho a *Meloidogyne javanica*. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 2, p. 259-265, 1998.

MANTOVANI, P.; VAN DER LINDEN, C.G.; MACCAFERRI, M.; SANGUINETI, M.C.; TUBEROSA, R. Nucleotide-binding site (NBS) profiling of genetic diversity in durum wheat . **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 11, p. 1473-1480, 2006.

MARATHE, R.; ANANDALAKSHMI, R.; LIU, Y.; DINESH-KUMAR, S.P The tobacco mosaic virus resistance gene, N. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 3, n. 3, p. 167–172, 2002.

MASSOLA, N.S.; PULCINELLI, C.E.; JESUS, W.C.; GODOY, C.V. Doenças do fumo. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 361-370.

MILLER, R. D. **TN 86**: a burley tobacco resistant to TVMV, TEV, and PVY. Knoxville: University of Tennessee, Department of Plant and Soil Science, Agricultural Experiment Station, Tobacco Experiment Station, 1987. 7 p. (Bulletin, 657).

MOORE, J.M.; BERTRAND, P.; STEPHENSON, M.G.; LAHUE, S. **Tobacco variety information**. Disponível em:

<<http://commodities.caes.uga.edu/fieldcrops/Tobacco/handbook/variety.html>>. Acesso em: 25 ago. 1998.

NG'AMBI T, B.S.; RUFTY, R.C.; BARKER, K.R. Genetic analysis of *Meloidogyne arenaria* race 1 resistance in tobacco. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 9, p. 810-813, 1999.

NORTH CAROLINA CROP IMPROVEMENT ASSOCIATION. Disponível em:

<<http://www.nccrop.com/varieties.php/0/all>>. Acesso em: 01 jun. 2008.

PADMANABHAN, M. S.; SHIFERAW, H.; CULVER, J. N. *The Tobacco mosaic virus* replicase protein disrupts the localization and function of interacting aux/iaa proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 864–873, 2006.

PALANICHELAM, K.; COLE, A.B.; SHABABI, M.; SCHOELZ, J. Agroinfiltration of *Cauliflower mosaic virus* gene VI elicits hypersensitive response in *Nicotiana* species. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, n.11, p. 1275-1279, 2000.

PARAN, I.; AFTERGOOT, E; SHIFRISS, C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 99, n. 3, p.167 -173, 1998.

REN, N.; TIMKO, M.P. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. **Genome**, Ottawa, v. 44, n. 4, p. 559-571, 2001.

RIBEIRO, N.R.; VELOSO, J.F.; SILVA, W.F.; MEIRELLES, A.G.; CRAVEIRO, S.; NETTO PARENTONI, F.; GIACOMINI DOS SANTOS, A. Avaliação da resistência de genótipos de milho, sorgo e milheto a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça3. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 102-106, 2002

ROBERTSONA, L.; LÓPEZ-PÉREZA, J.A.; BELLOA, A.; DÍEZ-ROJOA, M.A.; ESCUERA, M.; PIEDRA-BUENAA, A.; ROSB, C.; MARTÍNEZA, C. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum* L.). **Crop Protection**, Guildford, v. 25, p. 440-445, 2006.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H.J. Primer3 on the www for general users and for biologists programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatic methods and protocols in the series methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

SALIBA-COLOMBANI, V.; CAUSSE M.; GERVAIS, L., PHILOUZE, J. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 29-40, 2000.

SHEW; H.D.; LUCAS; G.B. **Compendium of tobacco diseases**. St. Paul: APS Press, 1991. 44 p.

SCHOELZ, J. E.; WIGGINS, B. E.; WINTERMANTEL, W. M.; ROSS, K. Introgression of a tombusvirus resistance locus from *Nicotiana edwardsonii* var. Columbia to *N. clevelandii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.96, p.453-459. 2006.

SCHOLTHOF, K.B.G. **The beginning of virology...time marches on**: the plant health instructor. 2001. Disponível em: <[http:// www.apsnet.org](http://www.apsnet.org)>. Acesso em: 28 maio 2008a.

_____. **Tobacco mosaic virus**: the plant health instructor. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/education/lessonsPlantPath/TMV>>. Acesso em: 10 maio 2008b.

SILVA, J.F.V.; DIAS, W.P.; MANZOTE, U.; GOMES, J. **Produção de grãos em ambientes com nematóides de galhas**. Londrina: Embrapa Soja; Fapeagro, 2001. 15 p.

SINDICATO DA INDÚSTRIA DO FUMO. Disponível em: <<http://www.sindifumo.com.br>>. Acesso em: 20 maio 2008.

SMITH, S.M.; HULBERT, S.H. Recombination events generating a novel *rp1* race specificity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.18, n.3, p.220-228. 2005.

SNOWDON R.J; FRIEDT, W. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. **Plant breeding**, Berlin, v. 123, n.1, p. 1-8, 2004.

SOUZA-SOBRINHO, F.; MALUF, E W.R.; GOMES, L.A.A.; CAMPOS, V.P. Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* race 2 in the hot pepper cultivar Carolina Cayenne (*Capsicum annuum* L.). **Genetic Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 3, p. 271-279, 2002.

SYED, N.H.; SORENSEN, A.P.; ANTONISE, R.; VAN DE WIEL, C.; VAN DER LINDEN, C.G.; WESTENDE, W. VAN 'T.; HOOFTMAN, D.A.P.; DEN NIJS, H.C.M.; FLAVELL, A. J. A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, p. 517-527, 2006.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes**: international *Meloidogyne* project, Raleigh: North Carolina State University, 1978. 111 p.

UNIVERSITY OF KENTUCKY. Disponível em:
<http://www.uky.edu/Ag/TobaccoProd/pubs_variety.html>. Acesso em: 01 jun. 2008.

UNIVERSITY OF VIRGINIA STATE. Disponível em:
<<http://www.ext.vt.edu/pubs/tobacco/436-047-00/00-table3.html>>
<<http://www.ext.vt.edu/pubs/tobacco/436-418-00/436-418.html>>. Acesso em: 01 jun. 2008.

VALLEAU, W.D. Control of the common mosaic disease of tobacco by breeding. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 1022-1025, 1942.

VAN DER HOORN, R.A. L.; KRUIJT, M.; ROTH, R.; BRANDWAGT, B.F.; JOOSTEN, M.H.A.J.; DE WIT, P.J. Intragenic recombination generated two distinct Cf genes that mediate AVR9 recognition in the natural population of *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n.18, p.10493-10498. 2001.

VAN DER LINDEN, C.G.; WOUTERS, D.C.A.E.; MIHALKA, V.; KOCHIEVA, E.Z.; SMULDERS, M.J.M.; VOSMAN, B. Efficiency targeting of plant resistance loci using NBS profiling. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, p. 384-393, 2004.

VIDAL, S.; CABRERA, H.; ANDERSSON, R.A. ; FREDRIKSSON, A.; VALKONEN J.P.T. Potato Gene Y-1 is an N Gene Homolog That Confers Cell Death Upon Infection with *Potato virus Y*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n.7, p. 717–727.2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 4407-4414, 1995.

VOS, P.; SIMONS, G.; JESSE, T.; WIJBRANDI, J.; HEINEN, L.R. The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature Biotechnology**, New York, v.16, p.1365–1369, 1998.

WHITHAM, S.; McCORMICK, S.; BAKER, B. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 16, p. 8776–8781, 1996.

WHITHAM, S.; DINESH-KUMAR, S.P.; CHOI, D; HEHL, R.; CORR, C.; BAKER, B. The product of *Tobacco mosaic virus* resistance Gene N: similarity to Toll and interleukin-1 receptor. **Cell**, London, v. 78, p. 1101-1115, 1994.

WILLIAMSON, V.A. Plant nematode resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 2, p. 327-331, 1999.

WILLIAMSON, V.A.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1735-1745, 1996.

YAMANAKA, T.; OHTA, T.; TAKAHASHI, M.; MESHI, T.; SCHMIDT, R.; DEAN, C.; NAITO, S.; ISHIKAWA, M. TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a Tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 10107-10112, 2000.

YOUNG, N.D.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm2* locus of tomato during backcross breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, p. 353-359, 1989.

ANEXOS

Tabela 6 - Resultados da fenotipagem (Fen) e genotipagem (Gen) da população segregante F2 para o ensaio de resistência a TMV. R=resistente e S=suscetível

Plan	Fen	Ge	Plan	Fen	Gen	Plan	Fen	Gen	Plan	Fen	Gen	Plan	Fen	Gen
1	R	R	41	S	S	81	R	R	121	S	S	161	R	R
2	R	R	42	R	R	82	S	S	122	R	R	162	R	R
3	S	S	43	R	R	83	R	R	123	S	S	163	S	S
4	R	R	44	S	S	84	S	S	124	R	R	164	R	R
5	R	S	45	S	S	85	R	R	125	R	R	165	S	S
6	R	R	46	R	R	86	S	S	126	R	R	166	S	S
7	R	R	47	R	R	87	R	R	127	R	R	167	R	R
8	R	R	48	S	S	88	R	R	128	R	R	168	R	R
9	R	R	49	R	R	89	R	R	129	S	S	169	S	S
10	R	R	50	R	R	90	R	R	130	R	R	170	R	R
11	R	R	51	S	S	91	R	R	131	R	R	171	R	R
12	R	R	52	R	R	92	S	S	132	R	R	172	R	R
13	R	R	53	S	S	93	R	R	133	R	R	173	R	R
14	R	R	54	R	R	94	R	R	134	R	R	174	S	S
15	R	R	55	R	R	95	S	S	135	R	R	175	R	R
16	R	R	56	S	S	96	R	R	136	R	R	176	R	R
17	R	R	57	S	S	97	R	R	137	R	R	177	R	R
18	S	S	58	S	S	98	s	s	138	R	R	178	R	R
19	R	R	59	R	R	99	R	R	139	R	R	179	R	R
20	S	R	60	R	R	100	R	R	140	R	R	180	R	R
21	S	S	61	R	R	101	R	R	141	S	S	181	S	S
22	R	R	62	R	R	102	R	R	142	R	R	182	R	R
23	R	R	63	R	R	103	R	R	143	S	S	183	R	R
24	R	R	64	R	R	104	R	R	144	R	R	184	R	R
25	R	R	65	R	R	105	R	R	145	S	S	185	R	R
26	R	R	66	R	R	106	R	R	146	R	R	186	R	R
27	S	S	67	R	R	107	R	R	147	S	S	187	R	R
28	R	R	68	R	R	108	R	R	148	R	R	188	R	R
29	S	S	69	R	R	109	R	R	149	S	S	189	R	R
30	R	R	70	S	S	110	R	R	150	R	R	190	R	R
31	R	R	71	S	S	111	R	R	151	R	R	191	R	R
32	R	R	72	R	R	112	R	R	152	R	R	192	R	R
33	R	R	73	R	R	113	R	R	153	R	R	193	R	R
34	R	R	74	R	R	114	R	R	154	S	S	194	R	R
35	S	S	75	R	R	115	R	R	155	S	S	195	R	R
36	S	S	76	S	S	116	R	R	156	R	R	196	R	R
37	R	R	77	R	R	117	R	R	157	R	R	197	S	S
38	R	R	78	R	R	118	R	R	158	R	R	198	R	R
39	R	R	79	S	S	119	R	R	159	R	R	199	s	s
40	R	R	80	S	S	120	R	R	160	R	R	200	R	R

Tabela 7 - Resultados da fenotipagem da população segregante F2 para o ensaio de resistência a *M.incognita* raça 3

Planta	Fenótipo	Planta	Fenótipo	Planta	Fenótipo
1	R	49	S	97	R
2	R	50	S	98	R
3	R	51	R	99	S
4	S	52	R	100	R
5	R	53	R	101	R
6	R	54	R	102	R
7	R	55	R	103	R
8	R	56	S	104	R
9	R	57	R	105	R
10	S	58	S	106	R
11	S	59	R	107	R
12	S	60	R	108	R
13	S	61	R	109	R
14	R	62	R	110	S
15	R	63	S	111	R
16	R	64	R	112	S
17	R	65	R	113	R
18	R	66	R	114	S
19	S	67	R	115	R
20	R	68	R	116	S
21	R	69	S	117	S
22	R	70	R	118	R
23	R	71	R	119	S
24	S	72	R	120	S
25	R	73	R	121	R
26	R	74	-	122	R
27	R	75	S	123	R
28	R	76	S	124	R
29	R	77	R	125	R
30	R	78	R	126	R
31	S	79	R	127	R
32	R	80	R	128	S
33	R	81	R	129	R
34	R	82	R	130	S
35	R	83	S	131	R
36	-	84	R	132	S
37	R	85	R	133	R
38	S	86	S	134	R
39	R	87	S	135	R
40	R	88	R	136	R
41	R	89	S	137	R
42	R	90	R	138	R
43	S	91	S	139	R
44	S	92	R	140	S
45	R	93	R	141	S
46	R	94	R	142	S
47	S	95	R	143	R
48	R	96	R	144	R

Tabela 8 - Resultados da fenotipagem da população RCF1 para o ensaio de resistência a *M.incognita* raça 3

Planta	Fenótipo	Planta	Fenótipo	Planta	Fenótipo
1	-	49	R	97	R
2	R	50	S	98	S
3	R	51	S	99	R
4	R	52	S	100	R
5	R	53	-	101	S
6	S	54	-	102	R
7	S	55	R	103	R
8	S	56	R	104	S
9	S	57	S	105	R
10	S	58	S	106	R
11	R	59	S	107	S
12	R	60	S	108	S
13	R	61	R	109	R
14	R	62	S	110	R
15	R	63	S	111	S
16	R	64	S	112	R
17	R	65	-	113	R
18	S	66	S	114	S
19	R	67	R	115	S
20	R	68	S	116	S
21	R	69	R	117	R
22	S	70	R	118	R
23	S	71	R	119	R
24	S	72	R	120	R
25	S	73	S	121	R
26	S	74	R	122	S
27	R	75	S	123	R
28	S	76	R	124	R
29	R	77	R	125	R
30	R	78	S	126	R
31	R	79	R	127	S
32	S	80	S	128	S
33	S	81	S	129	R
34	R	82	S	130	S
35	S	83	R	131	S
36	S	84	S	132	S
37	S	85	S	133	S
38	S	86	S	134	R
39	S	87	S	135	S
40	R	88	S	136	S
41	S	89	S	137	R
42	R	90	-	138	R
43	S	91	S	139	R
44	R	92	-	140	R
45	S	93	S	141	S
46	R	94	S	142	S
47	S	95	R	143	R
48	R	96	R	144	-