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

**Parâmetros genéticos da resistência à murcha-bacteriana em porta-enxertos
de tomateiro**

Gabriel Lourenço Lopes

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2018**

Gabriel Lourenço Lopes
Engenheiro Agrônomo

Parâmetros genéticos da resistência à murcha-bacteriana em porta-enxertos de
tomateiro

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO ANGELO PIOTTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Lopes, Gabriel Lourenço

Parâmetros genéticos da resistência à murcha-bacteriana em porta-enxertos de tomateiro / Gabriel Lourenço Lopes. - - Piracicaba, 2018.

77 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Tomateiro 2. Porta-enxerto 3. *Ralstonia solanacearum* 4. Capacidade de combinação 5. Resistência 6. Sistema radicular. I. Título

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente meus pais Dirceu Aparecido Lourenço Lopes e Maria Ines Claro dos Santos Lopes e meu irmão Leonardo Lourenço Lopes pelo pelos ensinamentos e apoio durante toda minha vida e todo o apoio durante essa etapa;

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Angelo Piotto, pela orientação, apoio, ensinamento e principalmente paciência com as coisas erradas que os alunos fazem durante toda a pós-graduação;

Aos professores da ESALQ e do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas pelas disciplinas cursadas durante a graduação e o mestrado que diretamente contribuíram no trabalho;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) pela bolsa de estudos e financiamento do trabalho.

A todos os técnicos do Departamento de Genética pela grande ajuda na realização dos experimentos desse trabalho.

Aos amigos de Pós-Graduação Felipe Maniero Nazato, Fernando Garcia Espolador, Elesandro Bornhofen, Pedro Augusto Medeiros Barbosa, Rafael Massahiro Yassue, Matheus Dalsente Krause; pelos ensinamentos, amizade e estudos juntos.

Aos amigos que ajudaram nos trabalhos, Leonardo Gotardi, Mariana Niederheitman, Vitória Annicchini, Bruna Longatti, Iris Shimano, Gabriel Molina, Gabriel Cypriano e Rafael Nalin.

Ao querido José Carmezini de Paula, pela amizade, pela grande ajuda em todos os trabalhos, pela paciência que não era tão grande assim hahaha, e por toda conversa fiada em todo tempo que eu fiquei na ESALQ;

E por último e principalmente, à Jéssica Thais de Lira Bazzetto, por todo seu apoio, amizade, amor, ajuda nos fins de semana e feriados e nos momentos mais difíceis durante todo esse período do mestrado, porque sem a sua ajuda eu não teria conseguido.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
REFERÊNCIAS.....	12
2. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE INDUÇÃO DE MURCHA-BACTERIANA EM TOMATEIRO POR MEIO DE INFECÇÃO ARTIFICIAL CONTROLADA.....	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT	15
2.1. INTRODUÇÃO	16
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
2.4. CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	23
3. ANÁLISE DIALÉLICA PARA RESISTÊNCIA À MURCHA BACTERIANA EM TOMATEIRO.....	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT	27
3.1. INTRODUÇÃO	28
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.1. <i>Material vegetal e hibridações.....</i>	<i>30</i>
3.2.2. <i>Material microbiano para experimento de avaliação precoce de resistência à murcha-bacteriana.....</i>	<i>30</i>
3.2.3. <i>Inoculação de Ralstonia solanacearum em plântulas de tomateiro.....</i>	<i>31</i>
3.2.4. <i>Avaliação de resistência à murcha-bacteriana em área de campo naturalmente infestada com Ralstonia spp.....</i>	<i>32</i>
3.2.5. <i>Análises estatísticas.....</i>	<i>33</i>
3.2.6. <i>Análise da capacidade de combinação</i>	<i>33</i>
3.2.7. <i>Estimativa das Heteroses</i>	<i>34</i>
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.3.1. <i>Avaliação precoce de resistência ao biovar 2 de Ralstonia solanacearum em tomateiro</i>	<i>34</i>
3.3.2. <i>Avaliação da resistência à murcha-bacteriana em tomateiro em de solo infestado com Ralstonia spp.....</i>	<i>41</i>
3.4. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS.....	48
4. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE PORTA ENXERTOS DE TOMATEIRO CULTIVADOS EM SOLO INFESTADO E NÃO INFESTADO POR RALSTONIA SPP.....	51
RESUMO.....	51
ABSTRACT	51
4.1. INTRODUÇÃO	52
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.2.1. <i>Material vegetal e hibridações.....</i>	<i>54</i>
4.2.2. <i>Experimentos em área infestada e não infestada com Ralstonia spp.....</i>	<i>54</i>
4.2.3. <i>Avaliação de parâmetros de desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular em ambiente protegido</i>	<i>55</i>
4.2.4. <i>Análises genético-estatísticas dos experimentos de campo.....</i>	<i>56</i>
4.2.4.1. <i>Análise da capacidade de combinação nos experimentos de campo</i>	<i>56</i>
4.2.4.2. <i>Estimativa das heteroses nos experimentos de campo</i>	<i>57</i>
4.2.5. <i>Análises genético-estatísticas do experimento em ambiente protegido.....</i>	<i>57</i>
4.2.5.1. <i>Análise da capacidade de combinação do experimento em ambiente protegido</i>	<i>58</i>
4.2.5.2. <i>Estimativa das heteroses no experimento em ambiente protegido</i>	<i>58</i>
4.2.6. <i>Coefficientes de Correlação</i>	<i>59</i>
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59

4.4. CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	74
ANEXO	77

RESUMO

Parâmetros genéticos da resistência à murcha-bacteriana em porta-enxertos de tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das plantas cultivadas de maior importância no mundo, sendo uma das principais hortaliças em importância econômica no Brasil. A murcha-bacteriana é uma doença dentre as mais limitantes para a cultura do tomateiro e o uso de cultivares resistentes à *Ralstonia* spp. é uma das únicas alternativas para evitar as perdas causadas por esse patógeno. Contudo, existem raríssimos estudos sobre a base genética de genótipos resistentes aos principais isolados de *Ralstonia* spp. Objetivou-se nesse trabalho estudar parâmetros genéticos da resistência à murcha-bacteriana em linhagens e híbridos usados como porta-enxertos de tomateiro, por meio de abordagens complementares que envolvem desde o ajuste das metodologias para indução artificial da doença, até estimativas das capacidades de combinação e a heterose entre linhagens, visando identificar cruzamentos promissores para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético para resistência à murcha-bacteriana em tomateiro para porta-enxertos. Comparando-se quatro métodos de indução da resistência verificou-se que o método da lesão das raízes do torrão com objeto cortante (bisturi) e pulverização de 5 mL da suspensão bacteriana no torrão, comparativamente aos outros métodos avaliados, apresenta fácil execução, requer quantidades reduzidas de suspensão bacteriana e proporciona boas quantidades de plantas de tomateiro com sintomas de murcha-bacteriana, sendo o mais adequado entre os métodos testados. Foi estimada a heterose e capacidade de combinação entre linhagens de tomateiro para um isolado do biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em estágio de plântulas, em ambiente protegido, e em um solo naturalmente infestado por *Ralstonia* spp. Entre as linhagens avaliadas, apenas o genótipo Hawaï 7996 apresentou níveis aceitáveis de resistência, sendo necessário encontrar novas fontes de resistência para o início de um programa de melhoramento. Verificou-se que nenhuma das progênies derivadas dos cruzamentos desse estudo apresentaram resistência superior ao parental superior. Além disso, foi verificada a importância dos efeitos aditivos e, consequentemente, os cruzamentos de genitores com alta CGC para o caráter e a seleção recorrente seriam as melhores alternativas no melhoramento para resistência à murcha-bacteriana. Finalmente, foram estudados os genitores e seus híbridos, utilizados como porta-enxerto em condições de campo e em ambiente protegido visando o aumento da resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia* spp., e incremento dos parâmetros produtivos de um híbrido comercial utilizado como copa. Verificou-se influência dos diferentes porta-enxertos em caracteres de produção e massa dos frutos e no desenvolvimento de copa. Caracteres relacionados ao sistema radicular dos porta-enxertos apresentaram heterose em relação aos seus genitores, com efeitos aditivos e não aditivos importantes, mostrando o desempenho das linhagens e sua contribuição para a produção de híbridos superiores. Por fim, este estudo possibilitou o melhor entendimento sobre a base genética da resistência em genótipos de tomateiro que possuem uso potencial como porta-enxertos resistentes à murcha-bacteriana.

Palavras-chave: Tomateiro; Porta-enxerto; *Ralstonia solanacearum*; Capacidade de combinação; Resistência; Sistema radicular

ABSTRACT

Genetic parameters of bacterial wilt resistance in tomato rootstocks

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important cultivated plants in the world, being one of the main vegetables of economic importance in Brazil. The bacterial wilt is one of the most limiting diseases for the tomato crop and the use of resistant cultivars to *Ralstonia* spp. is one of the only alternatives to avoid losses caused by this pathogen. However, there are very few studies on the genetic basis of genotypes resistant to the main isolates of *Ralstonia* spp. The objective of this work was to study the genetic parameters of resistance to bacterial wilt in lines and hybrids used as tomato rootstocks, through complementary approaches that range from the adjustment of the methodologies for artificial induction of the disease, to estimates of the combining abilities and heterosis among lines, aiming to identify promising crosses for the establishment of a rootstock genetic breeding program for resistance to bacterial wilt in tomatoes. Comparing four resistance induction methods, it was verified that the method of injuring roots with cutting object (scalpel) and spraying 5 mL of the bacterial suspension in the clod compared to the other's methods evaluated, is easiest to perform, requires less amounts of bacterial suspension and provides good amounts of tomato plants with wilt symptoms, being the most suitable among the methods tested. The heterosis and combining ability of tomato lines for a strain of biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in greenhouse at seedling stage and in soil naturally infested by *Ralstonia* spp were estimated. Among the lines evaluated, only the Hawaii 7996 genotype showed acceptable levels of resistance, and it is necessary to find new sources of resistance for the beginning of a breeding program. It was verified that none of the progenies derived from the crosses of this study presented superior resistance to the superior parental. In addition, the importance of the additive effects was verified and, consequently, the crossings of parents with high CGC for the character and the recurrent selection would be the best alternatives in the improvement for resistance to bacterial wilt. Finally, we studied the parents and their hybrids, used as rootstocks under field conditions and in a protected environment aiming the increasing resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia* spp., and increasing of the yield parameters of a commercial hybrid used as a scion. The influence of the different rootstocks was verified in characters of yield and mass of the fruits and in the development of the scion. Characteristics related to the root system of rootstocks showed heterosis in relation to their parents, with important additive and non-additive effects, showing the performance of the lines and their contribution to the production of superior hybrids. Finally, this study allowed a better understanding of the genetic basis of resistance in tomato genotypes that have potential use as bacterial wilt resistant rootstocks.

Keywords: Tomato; Rootstock; *Ralstonia solanacearum*; Combining ability; Resistance; Root system

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das plantas cultivadas de maior importância no mundo. Em 2016, a produção mundial de tomate foi de aproximadamente 177 milhões de toneladas, em uma área estimada de 4,78 milhões de hectares (FAO 2016). Sua área cultivada tem aumentado a cada ano, sendo uma cultura que demanda altos investimentos monetários por unidade de área plantada, podendo ultrapassar R\$ 100.000,00 ha para implantação e condução das plantas no campo (CEPEA 2016). Uma das principais características da tomaticultura no Brasil é que, ao contrário do que acontece nos países europeus, a maior parte do cultivo é realizada em campo aberto, onde as plantas estão sujeitas às mais diversas variações ambientais, tais como excesso de chuvas, temperaturas muito elevadas ou muito baixas, ventos fortes, entre outras. Estas variações climáticas favorecem muito a ocorrência de adversidades na cultura, expondo-a ao ataque de insetos-praga e principalmente de doenças.

O tomate pertence à família das Solanáceas, a qual também inclui outras espécies amplamente cultivadas como a batata, o tabaco, a pimenta, o pimentão e a berinjela. O tomateiro teve a sua origem na região que compreende o Sul do Equador até o Norte do Chile, porém foi domesticada no México e introduzida na Europa em 1544, primeiramente para fins de paisagismo e somente mais tarde, para consumo humano. Posteriormente, disseminou-se da Europa para a Ásia, África e Oriente Médio e, somente mais recentemente, o tomate domesticado foi trazido para outras partes da América do Sul. O processo de domesticação do tomateiro fora de seu centro de origem, o tamanho reduzido das populações que foram levadas para a Europa e o próprio melhoramento genético da cultura, fizeram com que esta espécie sofresse com um estreitamento significativo de sua base genética (Bai and Lindhout 2007), cujas consequências são bastante evidentes no cenário atual.

Assim, a cultura do tomateiro está entre aquelas que mais demandam a utilização de agroquímicos para o controle de doenças e insetos-praga. Em seu ciclo são realizadas mais de 40 aplicações de defensivos, com aproximadamente 15 diferentes ingredientes ativos para controlar insetos-praga, doenças fúngicas e bacterianas. Deste modo, verifica-se que a manutenção da sanidade da cultura é uma tarefa onerosa em termos financeiros e operacionais, sendo o cultivo do tomateiro em campo aberto no Brasil uma atividade de alto risco, havendo também o agravante da excessiva utilização de agroquímicos ser nociva à saúde humana.

Dentre as doenças que afetam o tomateiro, aquelas causadas por bactérias são as mais destrutivas, atingindo tanto plantas sob cultivo protegido quanto em campo aberto. Existem quatro doenças bacterianas importantes na cultura do tomateiro: a murcha-bacteriana ou murchadeira (*Ralstonia spp.*), o cancro-bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), a pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) e a mancha-bacteriana (*Xanthomonas spp.*) (Yang and Francis 2007, Jones *et al.* 2014). Diversas são as fontes de inóculo destas bactérias, as quais podem ser transmitidas pelas sementes ou através de populações que permanecem como epífitas em plântulas e plantas adultas assintomáticas, resistindo também em restos culturais e plantas hospedeiras, podendo posteriormente aparecer como patogênicas (Lopes 2009).

As condições para que uma doença bacteriana ocorra, bem como a severidade de sua epidemia na lavoura, são compostas por múltiplos fatores. Entre estes, destacam-se a quantidade de inóculo, a existência de múltiplas espécies e raças do patógeno, a eficiência dos defensivos aplicados na cultura, o desenvolvimento de resistência das populações bacterianas aos defensivos utilizados, o clima quente e úmido e a falta de resistência genética das cultivares comerciais (Lopes and Quezado-Duval 2005). O controle das doenças bacterianas não é efetivo quando a epidemia se instala na cultura, de forma que a prevenção é a melhor forma de evitá-la. No caso da murcha-bacteriana, o controle químico não é economicamente viável e, além de ser potencialmente danoso ao meio

ambiente, não foi comprovada sua eficiência para erradicar o agente causal (Saddler 2005, Denny 2007). Existem relatos de que a bactéria pode iniciar uma infecção em camadas de até um metro de profundidade (Hayward 1991), o que pode ser explicado pela localização do patógeno nas camadas mais profundas do solo (Wenneker *et al.* 1999).

A murcha-bacteriana do tomateiro foi descrita pela primeira vez por (Smith 1896), sendo uma das mais sérias doenças do tomateiro cultivado em regiões tropicais, subtropicais e algumas regiões de clima ameno no mundo (Hayward 1991). Existem relatos de cepas tolerantes ao frio capazes de infectar tomate, batata e gerânio no norte da Europa e na América do Norte (Wenneker *et al.* 1999, Williamson *et al.* 2002, Kim *et al.* 2003), o que tem aumentado a preocupação sobre a propagação desta doença em regiões temperadas, haja visto que a murcha-bacteriana é atualmente uma das doenças de maior impacto na produção de tomate em várias partes do mundo.

A murcha-bacteriana é uma doença causada por bactérias do gênero *Ralstonia* spp. (Safni *et al.* 2014, Prior *et al.* 2016), um complexo de espécies com ampla variabilidade que causam uma doença vascular sistêmica no tomateiro. O patógeno varia consideravelmente de acordo com o clima, práticas de manejo, tipo de solo e localização geográfica (Hayward 1991). A bactéria invade a planta do tomateiro e a infecta com o surgimento das raízes secundárias (Vasse *et al.* 1995). Ela coloniza os vasos xilemáticos e se espalha rapidamente dentro da planta, uma vez que, sob condições favoráveis (cultivar suscetível e ambiente quente e úmido), a bactéria se aloja nos vasos condutores de água e se multiplica, produzindo alta população de células, as quais produzem exsudados viscosos compostos de células bacterianas e polissacarídeos, que acabam entupindo o xilema (Lopes 2009).

A infecção interrompe o transporte de água na planta, o que causa inicialmente o seu principal sintoma de murcha e posteriormente sua morte. A patogenicidade da *Ralstonia* spp. é atribuída a uma ampla gama de hospedeiros, distribuição generalizada e grande variação genética do patógeno (Hayward 1991). A bactéria tem uma excelente capacidade de sobrevivência no solo e em raízes de plantas não hospedeiras. Entretanto, não há evidências de que ela sobreviva como epífita na superfície de outras plantas (Kellman *et al.* 1994). A doença manifesta-se em qualquer estágio do desenvolvimento da planta, embora seja mais comum na fase de formação do primeiro cacho de frutos. Ao se multiplicar no interior da planta, a bactéria também produz enzimas que provocam o escurecimento do xilema, que podem ser vistos através de um corte longitudinal do caule na parte inferior de plantas afetadas (Lopes and Quezado-Soares 1997). Em alguns casos ocorre a formação de raízes adventícias na parte inferior do caule, que é uma reação da planta à falta de água suficiente para mantê-la túrgida (Lopes 2009).

Existem várias estratégias para o controle da murcha-bacteriana, uma vez que esta bactéria tenha sido detectada na área. As principais delas são bastante comuns a outras doenças, tais como a rotação de culturas, plantio em épocas de clima mais ameno, manejo de água de irrigação e uso de sementes sadias (Lopes and Quezado-Duval 2005). Tais medidas de controle são relativamente eficientes quando as infestações são baixas, porém uma vez que as infestações são altas, nenhuma medida cultural ou o uso de defensivos, sejam químicos ou biológicos é suficiente para evitar as perdas. O principal problema enfrentado pelos agricultores é que quando a murcha-bacteriana aparece na área, sua erradicação é praticamente impossível, havendo uma tendência de aumento nas quantidades de inóculos a cada ciclo cultural, o que pode inviabilizar o uso da área para a tomaticultura em poucos anos.

Diante deste cenário, o uso de cultivares resistentes à *Ralstonia* spp. tem sido uma das únicas alternativas para evitar a doença. Em tomateiro, uso de genótipos com resistência à murcha-bacteriana possui duas vertentes, sendo que a primeira delas refere-se ao uso de cultivares resistentes para cultivo em pé-franco; e a segunda delas o uso de cultivares porta-enxertos resistentes. No caso do uso de cultivares resistentes para cultivo em pé-franco, os genes de resistência já estão incorporados na cultivar. Contudo, existem trabalhos que mostram que os principais genes de resistência à murcha-bacteriana estão associados à características indesejáveis de frutos (Denny 2007). Por

essa razão, a abordagem mais comum é o uso de porta-enxertos resistentes, que nada mais são do que cultivares que possuem resistências tanto à murcha-bacteriana quanto a outras doenças de solo. Nesse caso, é necessário que cultivares comerciais de alto rendimento, porém susceptíveis à doença, sejam enxertadas sobre cultivares resistentes, (porta-enxertos), o que permite explorar os benefícios de ambos os genótipos, em termos de resistência e vigor.

A prática da enxertia em nível comercial teve início do século XX no Japão (Oda 2002, Kubota *et al.* 2008). O método ganhou popularidade tanto na tomaticultura sob cultivo protegido como em campo aberto, visando evitar doenças causadas por patógenos de solo e também para aumentar o vigor das plantas enxertadas. A utilização de genótipos resistentes como porta-enxertos tem se mostrado muito promissora para o aproveitamento de solos contaminados no plantio de tomate de mesa (Baptista *et al.* 2006), embora se saiba que o nível de controle é variável, visto que os porta-enxertos reagem de forma diferente de acordo com os biovars da bactéria presentes no solo (Wang *et al.* 2000, Wicker *et al.* 2007, CH Lin *et al.* 2008, Lopes *et al.* 2015). Atualmente, não existem cultivares de tomate com nível adequado de resistência à murcha-bacteriana (Lopes and Quezado-Duval 2005), embora a sua busca tenha sido uma prioridade em vários programas de melhoramento em todo o mundo (Scott *et al.* 2005, Huet 2014).

No Brasil, diversas empresas já possuem porta-enxertos comerciais resistentes à murcha-bacteriana. Contudo, o nível de resistência e incremento em vigor proporcionado por cada um deles é variável. Por outro lado, as Universidades e Institutos de Pesquisa no Brasil praticamente não têm desenvolvido e disponibilizado cultivares que possam ser usados como porta-enxertos pelos produtores, ou mesmo linhagens com potencial para uso como genitores em outros programas de melhoramento. Além disso, as fontes de resistência disponíveis não têm sido estáveis em função da existência de biovars da bactéria com diferentes níveis de virulência (Lopes *et al.* 1994, Wicker *et al.* 2007).

Conforme o cenário apresentado, temos que a murcha-bacteriana é uma doença dentre as mais limitantes para a cultura do tomateiro, havendo raríssimos estudos sobre a base genética de genótipos resistentes aos principais isolados de *Ralstonia* spp., que ocorrem especificamente nas condições tropicais do Brasil. De maneira geral, as principais linhagens que são fontes de resistência conhecidas para a murcha-bacteriana têm sido usadas de forma isolada como genitores em programas de melhoramento. Com isso, há poucas informações sobre o potencial de complementação dos genes de resistência e outros caracteres em suas combinações híbridas, as quais poderiam dar origem a populações de melhoramento para obtenção de genótipos ainda mais resistentes, ou mesmo dar origem diretamente a cultivares híbridas mais resistentes. Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi estudar parâmetros genéticos da resistência à murcha-bacteriana em porta-enxertos de tomateiro, por meio de abordagens complementares que envolvem desde o ajuste das metodologias para indução artificial da doença, até estimativas das capacidades de combinação e a heterose entre linhagens, visando identificar cruzamentos promissores para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético para resistência à murcha-bacteriana em tomateiro.

REFERÊNCIAS

- Bai Y and Lindhout P (2007) Domestication and Breeding of Tomatoes : What have We Gained and What Can We Gain in the Future ? **Annals of Botany** **100**: 1085–1094.
- Baptista MJ, Souza RB De, Pereira W, Lopes CA and Carrijo O a (2006) Efeito da solarização e biofumigação na incidência da murcha bacteriana em tomateiro no campo. **Horticultura Brasileira** **24**: 161–165.
- CEPEA (2016) Especial Tomate: Gestão Sustentável. **Hortifruti Brasil** **157**: 11–14.
- Denny T (2007) Plant pathogenic Ralstonia species. Springer, p. 573–644. In **Plant-associated bacteria**.
- FAO (2016) Production/Cultures. Available at <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/F>> Accessed on October 9, 2016.
- Hayward AC (1991) Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused By Pseudomonas Solanacearum. **Annu. Rev. Phytopathol.** 65–87.
- Huet G (2014) Breeding for resistances to Ralstonia solanacearum. **Frontiers in Plant Science** **5**: 715.
- Jones JB, Zitter TA, Momol TM and Miller SA (2014) **Compendium of Tomato Diseases and Pests**, Second Edition. Jones JB, Zitter TA, Momol TM, and Miller SA (eds). APS Press, 176p.
- Kellman A, Hartman GL and Hayward AC (1994) Introduction. CAB International, Wallingford, p. 1–7. In Hayward AC and Hartman GL (eds) **Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent Pseudomonas solanacearum**.
- Kim SH, Olson TN, Schaad NW and Moorman GW (2003) Ralstonia solanacearum Race 3, Biovar 2, the Causal Agent of Brown Rot of Potato, Identified in Geraniums in Pennsylvania, Delaware, and Connecticut. **Plant Disease** **87**: 450–450.
- Kubota C, McClure M a., Kokalis-Burelle N, Bausher MG and Roskopf EN (2008) Vegetable grafting: History, use, and current technology status in North America. **Hortscience** **43**: 1664–1669.
- Lin CH, Hsu ST, Tzeng KC and Wang JF (2008) Application of a preliminary screen to select locally adapted resistant rootstock and soil amendment for integrated management of tomato bacterial wilt in Taiwan. **Plant Disease** **92**: 909–916.
- Lopes CA (2009) **Murcha Bacteriana ou Murchadeira - Uma Inimiga do Tomateiro em Climas Quentes**. 1-8p.
- Lopes CA, Boiteux LS and Eschemback V (2015) Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira** **33**: 219–222.
- Lopes CA and Quezado-Duval AM (2005) Doenças Bacterianas. Embrapa Hortaliças, Brasília, p. 55–73. In Lopes CA and Avila AC (eds) **Doenças do Tomateiro**.
- Lopes CA and Quezado-Soares A (1997) **Doenças Bacterianas das Hortaliças**. 72p.
- Lopes CA, Quezado-Soares A and Melo P (1994) Differential Resistance of Tomato Cultigens to Biovars I and III of Pseudomonas solanacearum. **Plant Disease** **78**: 1091–1094.
- Oda M (2002) Grafting of Vegetable Crops. **Sei Rep Agric & Biol Sei** **54**: 49–72.
- Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B and Allen C (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen Ralstonia solanacearum into three species. **BMC genomics** **17**: 90.
- Saddler GS (2005) Management of bacterial wilt disease. APS Press, Saint Paul, p. 121–132. In Allen C, Prior P, and Hayward AC (eds) **Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex**.

- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L and Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. s.* **International journal of systematic and evolutionary microbiology** **64**: 3087–103.
- Scott JW, Wang JF and Hanson PM (2005) BREEDING TOMATOES FOR RESISTANCE TO BACTERIAL WILT, A GLOBAL VIEW. **Acta Horticulturae** 161–172.
- Smith EF (1896) A bacterial disease of tomato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). **United States Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology Bulletin** **12** 1–28.
- Vasse J, Frey P and Trigalet A (1995) Microscopic studies of inter-cellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** **8**: 241–251.
- Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L and Grimsley NH (2000) Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** **13**: 6–13.
- Wenneker M, Verdel MSW, Groeneveld RMW, Kempenaar C, Van Beuningen AR and Janse JD (1999) *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). **European Journal of Plant Pathology** **105**: 307–315.
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M and Prior P (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology** **73**: 6790–6801.
- Williamson L, Nakaho K, Hudelson B and Allen C (2002) *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2 Strains Isolated from Geranium Are Pathogenic on Potato. **Plant Disease** **86**: 987–991.
- Yang W and Francis D (2007) Genetics and Breeding for Resistance to Bacterial Diseases in Tomato: Prospects for Marker-assisted Selection. Science Publishers, p. 637. In Razdan MK and Mattoo AK (eds) **Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2: Tomato**.

2. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE INDUÇÃO DE MURCHA-BACTERIANA EM TOMATEIRO POR MEIO DE INFECÇÃO ARTIFICIAL CONTROLADA

Resumo

A definição das melhores estratégias para a seleção de genótipos resistentes à murcha-bacteriana (*Ralstonia* spp.) é um dos principais desafios dos programas de melhoramento do tomateiro, pois a avaliação sob condições de infestação natural, pode levar à escapes, devido à falta de homogeneidade de distribuição do patógeno nas áreas agrícolas. Além disso, podem ocorrer infecções múltiplas de diferentes biovars e outras doenças. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi comparar métodos de indução de murcha-bacteriana em tomateiro, por meio de indução artificial controlada. Para tanto, foram avaliados quatro métodos de inoculação, além de uma testemunha, em plântulas de tomateiro de 30 dias de idade: A) Injeção de 20 µL da suspensão bacteriana entre o cotilédono e a primeira folha com uma micropipeta; B) Lesão das raízes do torrão com objeto cortante (bisturi) e injeção de 5 mL da suspensão bacteriana no torrão com micropipeta; C) Lesão das raízes do torrão com objeto cortante (bisturi) e imersão do torrão de raízes na suspensão bacteriana por 30 segundos; D) Lesão das raízes do torrão com objeto cortante (bisturi) e pulverização de 5 mL da suspensão bacteriana no torrão; E) Testemunha sem inoculação bacteriana; em experimento realizado em vasos. Nestes testes, foi utilizado o isolado CNPH 489 (Biovar 1/Filótipo II) de *R. solanacearum*, sendo este o mais comum nas áreas de cultivo no Brasil. Após a inoculação, as plântulas foram transferidas para vasos em casa de vegetação, sendo os sintomas avaliados do 5º ao 21º dia após a inoculação. De forma geral, o método A induziu sintomas muito rapidamente, sendo bastante efetivo. Porém, este método exclui a possibilidade de avaliar mecanismos de resistência oriundos do sistema radicular das plantas. Já os métodos B, C e D foram eficientes em induzir sintomas de murcha, simulando melhor as infecções que ocorreriam em nível de campo, pelo fato de o inoculo ser colocado no sistema radicular. Por fim, foi possível concluir que o método D é o de mais fácil execução, requer quantidades reduzidas de suspensão bacteriana e proporciona boas quantidades de plantas de tomateiro com sintomas de murcha-bacteriana, sendo este o mais adequado para estudos de inoculação e indução precoce da doença.

Palavras-chave: Avaliação precoce; *Ralstonia* spp.; Melhoramento; *Solanum lycopersicum*

Abstract

The definition of the best strategies for the selection of genotypes resistant to bacterial wilt (*Ralstonia* spp.) is one of the main challenges of tomato breeding programs since evaluation under natural infestation conditions can lead to leaks due to the lack of homogeneity of pathogen distribution in agricultural areas. In addition, multiple infections of different biovars and other diseases may occur. For this reason, the objective of this work was to compare methods of induction of bacterial wilt in tomato, through controlled artificial induction. Four inoculation methods were evaluated in addition to one control, in 30-days-old tomato seedlings: A) Injection of 20 µL of the bacterial suspension between the cotyledon and the first leaf with a micropipette; B) Injury of the roots of the clod with cutting object (scalpel) and injection of 5 mL of the bacterial suspension in the clod with micropipette; C) Injury of the roots of the clod with cutting object (scalpel) and immersion of the root clod in the bacterial suspension for 30 seconds; D) Injury of the roots of the clod with cutting object (scalpel) and spraying 5 ml of the bacterial suspension in the clod; E) Witness without bacterial inoculation; an experiment performed on pots. In these tests, the isolate CNPH 489 (Biovar 1 / Phylotype II) of *R. solanacearum* was used, being this one the most common in the cultivated areas of Brazil. After inoculation, the seedlings were transferred to pots in a greenhouse, the symptoms being evaluated from the 5th to the 21st day after inoculation. In general, the method A induced symptoms very quickly and was quite effective. However, this method excludes the possibility of evaluating resistance mechanisms from the root system of plants. Methods B, C, and D were

efficient in inducing wilt symptoms, simulating better the infections that would occur at the field level, because the inoculum was placed in the root system. Finally, it was possible to conclude that method D is the easiest to perform, requires reduced amounts of bacterial suspension and provides good quantities of tomato plants with symptoms of bacterial wilt, which is the most suitable for inoculation and early induction studies of the disease.

Keywords: Early evaluation; *Ralstonia* spp.; Breeding; *Solanum lycopersicum*

2.1. Introdução

A murcha-bacteriana é causada por bactérias do gênero *Ralstonia* spp., as quais são muito persistentes no solo, mesmo em condições desfavoráveis para a sobrevivência destes microrganismos. As epidemias em tomates sob ambiente protegido ou campo aberto podem ser bastante severas, levando à ocorrência generalizada da doença nas áreas de cultivo, podendo também aparecer de forma mais localizada em porções da lavoura que apresentam condições mais propensas para o desenvolvimento do patógeno. Em cultivos que fazem uso da irrigação por gotejamento, é comum observar a ocorrência da murcha-bacteriana progredindo nas plantas de tomateiro ao longo das faixas úmidas formadas pelos gotejadores, devido à facilidade de locomoção das bactérias na solução solo. Contudo, a maioria dos solos contaminados não apresenta distribuição uniforme do patógeno, tornando a avaliação em nível de campo para fins de melhoramento pouco eficiente. Por esse motivo, diversos trabalhos de avaliação da resistência à murcha-bacteriana, por meio de inoculação artificial controlada da doença, tem sido realizados (Lopes *et al.* 1994, 2015, Gonzalez and Summers 1995, Hanson *et al.* 1998, Kim *et al.* 2003, 2016). Porém, raros trabalhos realizaram comparações entre as diferentes técnicas de inoculação existentes para determinação de sua eficiência no processo de seleção de plantas resistentes à murcha-bacteriana.

Alguns dos métodos mais comuns de inoculação de *Ralstonia* spp. para indução de murcha nas plantas são a imersão das raízes na solução bacteriana, ferimento do caule, ferimento da folha (Artal *et al.* 2012) aspersão da solução nas raízes (Lopes *et al.* 2015) infiltração das bactérias nas folhas (Macho *et al.* 2010), infestação do solo com bactérias (Singh and Siddiqui 2012, Fonseca *et al.* 2016), entre outros. Tais métodos possuem diferentes níveis de eficiência e são adequados de para uso em determinadas condições, devendo-se levar em consideração os objetivos da avaliação, as particularidades da interação entre o patógeno e o hospedeiro, além do estágio fenológico que as plantas são expostas ao agente patogênico. Assim, é importante conhecer um pouco melhor, sobre os principais aspectos que envolvem os mecanismos de infecção, estabelecimento e indução da murcha-bacteriana em tomateiro.

Inúmeros trabalhos sobre a biologia das bactérias do gênero *Ralstonia* spp. foram realizados, os quais têm desvendado várias vias reguladoras importantes, bem como o envolvimento de diferentes sistemas de secreção de proteínas (tipo II e tipo III), que são essenciais para funções de virulência desta bactéria, bem como para a detecção dos organismos eucarióticos e a sobrevivência dos mesmos dentro do hospedeiro (Vasse *et al.* 2000, Genin and Boucher 2002, Coll and Valls 2013, Peeters *et al.* 2013). A patogenicidade de *Ralstonia* spp. está ligada principalmente ao sistema de secreção de proteínas do tipo III que produz uma quantidade de aproximadamente 75 efetores do tipo III (T3E) em células vegetais (Coll and Valls 2013, Singh *et al.* 2018). Estudos de expressão de genes de *R. solanacearum* (Jacobs *et al.* 2012, Ferreira *et al.* 2017, Puigvert *et al.* 2017) forneceram várias pistas sobre as respostas adaptativas da bactéria dentro de seu hospedeiro. Recentemente, os papéis de diferentes moléculas e DNAses extracelulares foram considerados importantes, devido à sua relação com a patogenicidade ao hospedeiro (Kai *et al.*

2015, Mori *et al.* 2016, Tran *et al.* 2016, Hikichi *et al.* 2017). Apesar de importantes descobertas sobre a biologia de *R. solanacearum* (Marchetti *et al.* 2010, Guidot *et al.* 2014, Remigi *et al.* 2014, Peyraud *et al.* 2016, Hikichi *et al.* 2017), o conhecimento referente ao mecanismo de sua entrada no hospedeiro, crescimento e multiplicação da planta e os fatores que desencadeiam as funções de patogenicidade da bactéria dentro do hospedeiro, não foram ainda completamente desvendados.

Há uma percepção entre pesquisadores da área de que plantas mais jovens de tomateiro (mudas) são mais susceptíveis à *Ralstonia* spp. do que plantas adultas. Contudo, praticamente não há registros de pesquisas demonstrando tal fato e, por esse motivo, ainda é desconhecido se o patógeno atua diferentemente em plantas jovens (mudas) e plantas adultas em condições naturais. Outro ponto a ser considerado é a interação da própria microbiota do solo com as plantas e com *Ralstonia* spp., partindo do princípio que diferentes plantas entram em contato com os diferentes micro-organismos do solo, criando associações que poderiam modificar a interação entre patógeno e hospedeiro (Feau and Hamelin 2017). Portanto, uma população microbiana residente no solo pode interferir em testes de indução de murcha causada por *Ralstonia* spp. realizados sob condições de solos naturalmente infestados (efeito de supressividade do solo). Além do mais, transplantar e manter um grande número de plantas adultas de tomateiro no campo requer grandes quantidades de espaço, tempo e mão-de-obra, bem como elevados investimentos monetários, o que por vezes limita os trabalhos de melhoramento para seleção de genótipos resistentes. Portanto, uma das opções mais viáveis para indução da doença e avaliação da ocorrência de murcha-bacteriana em tomateiro, seria a avaliação precoce em estágio de plântulas, sendo esta abordagem utilizada por diversos autores (Pradhanang *et al.* 2000, Artal *et al.* 2012, Kumar *et al.* 2017).

Além disso, é importante considerar a própria forma de cultivo do tomateiro, no qual são primeiramente obtidas as mudas em condições de ambiente protegido e teoricamente livre de patógenos, as quais posteriormente são transplantadas para o solo. Isso quer dizer que o primeiro contato com o agente patogênico seria a partir do transplante das mudas no campo, o que torna os métodos de inoculação e avaliação precoce em estágio de plântulas, mais verossímeis com relação ao que ocorre no campo, com a vantagem adicional de controlar e uniformizar a infecção do patógeno nas plantas. Por fim, temos que o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar diferentes métodos de inoculação de *Ralstonia* spp., em plântulas de tomateiro, visando selecionar o método mais adequado para o uso em trabalhos de melhoramento, cujo propósito seja a seleção de plantas resistentes à murcha-bacteriana.

2.2. Material e Métodos

Para comparar os métodos de inoculação e indução de murcha em tomateiro, foi utilizada a cultivar Santa Cruz Kada, conhecida pela sua suscetibilidade à murcha-bacteriana. O isolado CNPH 489 (Biovar 1/Filotipo II) de *R. solanacearum* foi utilizado para o experimento, uma vez que o Biovar 1 é o mais comum nas lavouras de tomate no Brasil. A partir de um estoque bacteriano que permaneceu armazenado em freezer -80 °C, o isolado de *R. solanacearum* foi plaqueado em meio Kelman (Kelman 1954), cujas placas permaneceram por 48 horas a 28 °C em BOD. Colônias típicas do patógeno foram repicadas em meio Kelman líquido e permaneceram crescendo em agitador por 24 horas a 28 °C e 80 rpm. Em seguida os inóculos foram diluídos em água estéril e a suspensão bacteriana foi ajustada para uma densidade óptica de equivalente a 10^8 UFC/mL ($OD_{600nm} = 0,3$) (Hanson *et al.* 1998, Wang *et al.* 2000), utilizando espectrofotômetro. As inoculações foram realizadas quando as plantas apresentaram duas folhas completamente desenvolvidas (aproximadamente 30 dias após a semeadura).

Foram então utilizados os seguintes métodos de inoculação:

- A) Injeção de 20 µL da suspensão bacteriana entre o cotilédono e a primeira folha com uma micropipeta;
- B) Lesão das raízes do torrão com objeto cortante (bisturi) e injeção de 5 mL da suspensão bacteriana no torrão com micropipeta;
- C) Lesão das raízes do torrão com objeto cortante (bisturi) e imersão do torrão de raízes na suspensão bacteriana por 30 segundos;
- D) Lesão das raízes do torrão com objeto cortante (bisturi) e pulverização de 5 mL da suspensão bacteriana no torrão;
- E) Testemunha sem inoculação bacteriana.

Após a inoculação, as mudas foram incubadas em câmara úmida a 85% de umidade relativa, com temperatura de 30-32 °C durante o dia, e 25-27 °C durante a noite, com foto-período de 12 horas, durante 48 horas. Após esse período, as plantas foram transplantadas em casa de vegetação para vasos contendo solo corrigido de acordo com análise química. A irrigação por aspersão foi ajustada para seis vezes ao dia por cinco minutos cada uma e com controle do aquecimento noturno, de forma a evitar que a temperatura diminuísse a valores inferiores a 20 °C, o que poderia levar a escapes na colonização bacteriana.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e as parcelas compostas de um vaso de 15 litros, contendo quatro plantas inoculadas com o isolado bacteriano. A nota de severidade da doença consistiu em uma média da parcela, totalizando quatro tratamentos e uma testemunha com 10 repetições. As avaliações foram realizadas através do sistema proposto por (Winsted and Kelman 1952), no qual as observações dos sintomas ocorreram do 5º ao 21º dia após a inoculação. A escala de notas utilizada para a análise da doença foi a seguinte:

- 1: Sem sintomas;
- 2: Uma folha murcha;
- 3: Duas a três folhas murchas;
- 4: Quatro ou mais folhas murchas;
- 5: Toda a planta murcha (planta morta).

O cálculo da intensidade da murcha em 21 dias após a inoculação foi realizado usando a seguinte equação:

$$I = \left[\sum \frac{(n_j x v_i)}{(V x N)} \right] 100$$

Onde:

I = Intensidade de murcha (%);

n_i = número de plantas com o respectivo índice de doença;

v_i = índice da doença (1, 2, 3, 4 ou 5);

V = maior índice de doença (5);

N = número de plantas observadas.

Com os dados atendendo todas as exigências de normalidade e homogeneidade de variâncias, foi realizada a análise de variância (ANOVA), tomando-se os dados de intensidade da doença, conforme o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Em que:

y_{ij} : valor da observação do método i , na repetição j ;

μ : é a constante comum a todos os tratamentos (métodos);

t_i : efeito do método i , sendo $i = 1, \dots, i$;

e_{ij} : efeito do resíduo experimental do método i , na repetição j .

Como o valor da estatística F significativo, foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, para comparação de médias.

2.3. Resultados e discussão

A bactéria *Ralstonia solanacearum* é bastante agressiva quando encontra condições ideais, tais como o hospedeiro susceptível, umidade e temperatura elevadas. O biovar utilizado no experimento com diferentes métodos de inoculação do patógeno é um dos mais comuns e agressivos em condições de campo. Sendo um isolado típico, o mesmo foi capaz de induzir a murcha nas plantas de tomateiro, levando à ocorrência de sintomas em todos os métodos utilizados, conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1. Evolução dos sintomas de murcha-bacteriana ao longo do tempo, em função de diferentes métodos de inoculação de *Ralstonia solanacearum* em plântulas de tomateiro (cultivar Santa Cruz Kada)

Na figura 1 acima, são apresentadas as médias das notas de sintomas para cada tratamento ao longo do tempo, de acordo com o sistema proposto por (Winsted and Kelman 1952). Nesta figura fica evidente que alguns métodos são capazes de induzir sintomas mais rapidamente que outros, sendo que ao final de 21 dias, a média de notas foi elevada para todos os tratamentos indicando que a maior parte das plantas estava morta ou com sintomas severos de murcha, os quais posteriormente evoluíram para a morte dos tomateiros infectados.

A evolução dos sintomas ocorreu muito mais rapidamente nas plantas inoculadas com o método A, em relação aos demais. Na utilização do método A, os sintomas foram muito severos já a partir da primeira avaliação no 5º dia após a inoculação, com menor taxa de aumento nos dias posteriores e estabilização da ocorrência de sintomas a partir do 10º dia. Os tratamentos B, C e D apresentaram uma evolução mais uniforme entre eles e mais moderada quando comparadas ao método A, havendo uma diminuição da evolução dos sintomas e uma aparente estabilização a partir do 14º dia após a inoculação.

De forma geral, a inoculação pelo método A (injeção de suspensão bacteriana entre o cotilédone e a primeira folha) mostrou-se bastante agressiva, o que de certa forma era esperado, uma vez que grande quantidade de bactérias foi colocada diretamente nos tecidos a serem colonizados pelo patógeno. A consequência imediata deste procedimento é a elevada eficiência de indução da doença em curto período. Porém, não é um método que simula bem a situação real de infecção em nível de campo, no qual o contato primário do patógeno e infecção ocorrem por meio das raízes dos tomateiros. Neste sentido, os métodos B, C e D, embora tenham proporcionado evolução mais lenta dos sintomas, seriam mais adequados para simular infecções em nível de campo, pelo fato da inoculação do patógeno ser nas raízes das plântulas, as quais foram previamente lesionadas com um bisturi. Tais lesões artificiais são também uma simulação de possíveis lesões no sistema radicular dos tomateiros no momento do transplante das plantas, no solo naturalmente contaminado.

Embora neste trabalho o método A tenha proporcionado maior número de plantas com sintomas, (Artal *et al.* 2012), relataram que em seus estudos o método C (imersão das raízes lesionadas em suspensão bacteriana) proporcionou a ocorrência de plantas com maior número de sintomas quando comparado ao método A (injeção de suspensão bacteriana no caule). Provalmente esta e outras divergências entre a eficiência entre métodos de inoculação de *Ralstonia* spp. devem-se à diversos fatores tais como, a espécie e biovar utilizados, a cultivar de tomateiro usada como hoppedeira, e mesmo as condições ambientais durante o experimento. Por esse motivo, é imprescindível que diferentes métodos de inoculação de *Ralstonia* spp. sejam testados nas condições do local e ambiente da realização dos experimentos, para definir o método mais adequado para indução de murcha em tomateiro sob determinadas condições.

Ao final das avaliações realizadas entre o 5º e 21º dia após a inoculação, foi estimada a Intensidade de ocorrência de murcha (I) para cada método estudado, cujos percentuais foram obtidos em nível de média de parcela. Assim, no resumo da análise de variância apresentada na (tabela 1) foi possível observar que existem diferenças estatísticas significativas entre a Intensidade murcha induzida pelos diferentes métodos.

Tabela 1. Resumo da análise de variância dos métodos de inoculação de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro

F.V.	G.L.	Quadrados Médios
Métodos	4	16143,70*
Resíduo	45	158,30
Média geral		71,00%
C.V. (%)		17,72

*: significativo a 5% pelo teste F

Embora os dados deste tipo de experimento, ao final da avaliação, sejam dados percentuais, o coeficiente de variação do erro experimental foi satisfatório (C.V. = 17,72%), sendo adequado para experimentos dessa natureza, refletido boa precisão experimental. A partir da análise de variância, os dados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação entre as médias (tabela 2).

Tabela 2. Valores médios da Intensidade de ocorrência de murcha (%) em plântulas de tomateiro, submetidas a diferentes métodos de inoculação com *Ralstonia solanacearum*

Métodos	I (%)
A	97,5 a
C	90,0 ab
D	87,5 ab
B	80,0 b
E	0,0 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade de erro

O método A (tratamento de injeção de suspensão bacteriana no caule), como esperado, foi o que apresentou a maior Intensidade de murcha, com I = 97,5%, porém não diferiu significativamente dos métodos C (90%) e D (87,5%). Entretanto, apresentou maior Intensidade de murcha que o método B (80,0%) e E (0,0%, controle não inoculado). Os métodos C e D, de imersão do torrão na solução bacteriana e o de aspersão da solução no torrão, respectivamente, tiveram valores intensidade (I) muito próximos entre si. Já o método B, de injeção da solução na superfície apresentou uma intensidade de murcha um pouco inferior com um maior número de escapes. O método E (0%), que diferiu de todos os outros, não apresentou nenhuma planta morta, como era o esperado, mostrando que não houve interferência de uma possível contaminação natural do solo utilizado no experimento.

Embora o método A tenha apresentado os melhores resultados de incidência da doença e surgimento dos sintomas mais rapidamente, provavelmente ele não é a melhor escolha de método de inoculação pois, como o inóculo bacteriano é introduzido diretamente no xilema, é possível que esse método impeça a ação de possíveis diferentes mecanismos de resistência existentes nas plantas que impeçam a chegada da bactéria nos vasos xilemáticos, como verificado no método de injeção no caule (Artal *et al.* 2012, Kim *et al.* 2015, Kumar *et al.* 2017). Existem trabalhos recentes sobre a infecção por *Ralstonia* spp. em plântulas e por corte de folhas, como foi recentemente reportado por (Kumar *et al.* 2017). Porém, como as espécies de *Ralstonia* spp. infectam naturalmente seus

hospedeiros pela raiz, quando o método de inoculação introduz a bactéria em um local diferente do que ocorre na natureza, a reação à doença de uma planta resistente pode ser diferente do esperado, levando a um viés na avaliação da resposta de resistência do genótipo. Assim, se o mecanismo de resistência à *Ralstonia* spp. estiver relacionado ao sistema radicular as plantas, esses métodos impedem a sua ação, dificultando uma correta avaliação da resistência e ocasionando subestimativa do potencial de genótipos como fonte de resistência à este patógeno.

Por outro lado, o método C apresentou uma boa incidência da doença, porém é necessária uma grande quantidade de inóculo para sua utilização (muitos litros de suspensão bacteriana). Na instalação de experimentos com uma grande quantidade de plantas, a quantidade de inóculo a ser utilizada se torna um fator limitante. Além do mais, em alguns casos, os métodos do encharcamento do torrão e a inoculação do caule não foram apropriados para a análise de diferenças na patogenicidade em alguns mutantes de *Ralstonia solanacearum* (Macho *et al.* 2010). Já o método B, embora mais fácil de ser realizado (solução é injetada apenas na superfície superior do torrão), pode levar a alguns escapes, pois nem sempre o contato da suspensão bacteriana é efetivo, uma vez que a penetração desta suspensão em todo o torrão e contato com as raízes mais jovens e lesionadas, pode não ser uniforme. Desta maneira, o método D, de pulverização da solução envolta do torrão, apresenta uma relativa facilidade na sua execução, proporcionando boa intensidade de sintomas de murcha nas plantas, utilizando poucas quantidades de suspensão bacteriana. O método D provavelmente é o que mais se aproxima das condições que ocorrem na natureza onde, no solo em que a bactéria está presente, proporcionaria o contato e a infecção das raízes pelas bactérias patogênicas de *Ralstonia* spp. Neste método, as bactérias são alocadas nas adjacências do torrão e, com o crescimento radicular, ocorre o contato destas raízes com os microrganismos patogênicos, havendo bons índices de infecção.

De forma geral, mesmo com a utilização de um método eficiente, deve-se realizar adequações de protocolo de acordo com o isolado bacteriano que se está trabalhando, pois como mostram diversos trabalhos (Lemessa and Zeller 2007, Y-M Lin *et al.* 2008, Bocsanczy *et al.* 2014), existem diferenças de patogenicidade e persistência no ambiente entre as bactérias, onde não se sabe exatamente a quantidade de bactérias que realmente entram em contato com as plantas para causar a infecção. Portanto, selecionar e planejar a utilização de um método eficiente de inoculação de bactérias nas raízes das plantas é muito importante na avaliação de resistência à murcha-bacteriana em tomateiro.

Outro interessante metodologia não testada nesse trabalho, devido a sua recente publicação, é o método proposto por (Singh *et al.* 2018), baseado na inoculação radicular em plântulas de tomateiro com 6 a 7 dias de idade, que mostrou ser eficiente para induzir a doença em diferentes cultivares de tomate. (Singh *et al.* 2018) implementaram com sucesso o estudo de patogenicidade de isolados de *Ralstonia* spp. O método é razoavelmente rápido, fácil e econômico e necessita de muito menos inóculo de bactérias. Com base nestes resultados, este método de inoculação deve ser considerado em trabalhos futuros, pois pode ajudar significativamente nos estudos de resistência às bactérias do gênero *Ralstonia* em estágios de plântulas.

O índice de intensidade de murcha é o método mais comumente utilizado nos estudos de avaliação de sintomas da murcha-bacteriana, porém ele não fornece uma indicação direta do nível de resistência dos genótipos. Desse modo, para criar uma associação mais direta da escala dos valores visando a obtenção das estimativas de resistência de genótipos, propomos aqui o uso de um índice de resistência à doença (R), que pode ser obtido pela expressão $R = 100 - I$. Deste modo, é possível a obtenção de valores mais coerentes para designar genótipos com menor índice de murcha e portanto com maior resistência.

2.4. Conclusão

Embora cada método de inoculação possua suas vantagens e desvantagens, podemos concluir que para o propósito de avaliar o nível de resistência à *Ralstonia* spp. em tomateiro, o método mais adequado nas condições do presente estudo foi o método da lesão das raízes do torrão com objeto cortante (bisturi) e pulverização de 5 mL da suspensão bacteriana no torrão (método D). Comparativamente aos outros métodos avaliados, tem-se que este método é de fácil execução, requer quantidades reduzidas de suspensão bacteriana e proporciona boas quantidades de plantas de tomateiro com sintomas de murcha-bacteriana.

Referências

- Artal RB, Gopalakrishnan C and Thippeswamy B (2012) An efficient inoculation method to screen tomato , brinjal and chilli entries for bacterial wilt resistance. **Pest Management in Horticulture Ecosystems** 18: 70–73.
- Bocsanczy AM, Achenbach UCM, Mangravita-Novo A, Chow M and Norman DJ (2014) Proteomic comparison of *Ralstonia solanacearum* strains reveals temperature dependent virulence factors. **BMC Genomics** 15: 1–14.
- Coll NS and Valls M (2013) Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system. **Microbial Biotechnology** 6: 614–620.
- Feau N and Hamelin RC (2017) Say hello to my little friends : how microbiota can modulate tree health. **New Phytologist** 215:737-74: 508–510.
- Ferreira V, Pianzzola MJ, Vilaró FL, Galván GA, Tondo ML, Rodriguez M V., Orellano EG, Valls M and Siri MI (2017) Interspecific Potato Breeding Lines Display Differential Colonization Patterns and Induced Defense Responses after *Ralstonia solanacearum* Infection. **Frontiers in Plant Science** 8: 1–14.
- Fonseca NR, Oliveira LSS, Guimarães LMS, Teixeira RU, Lopes CA and Alfenas AC (2016) An efficient inoculation method of *Ralstonia solanacearum* to test wilt resistance in *Eucalyptus* spp. **Tropical Plant Pathology** 41: 42–47.
- Genin S and Boucher C (2002) *Ralstonia solanacearum*: Secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. **Molecular Plant Pathology** 3: 111–118.
- Gonzalez WG and Summers WL (1995) A comparison of *Pseudomonas solanacearum*-resistant tomato cultivars as hybrid parents. **Journal of the American Society for Horticultural Science** Vol. 120 , 6 ; 891-895 (1995) 120: 891–895.
- Guidot A, Jiang W, Ferdy JB, Thébaud C, Barberis P, Gouzy J and Genin S (2014) Multihost experimental evolution of the pathogen *ralstonia solanacearum* unveils genes involved in adaptation to plants. **Molecular Biology and Evolution** 31: 2913–2928.
- Hanson PM, Licardo O, Hanudin, Wang J-F and Chen J (1998) Diallel Analysis of Bacterial Wilt Resistance in Tomato Derived from Different Sources. **Plant Disease** 82: 74–78.
- Hikichi Y, Mori Y, Ishikawa S, Hayashi K, Ohnishi K, Kiba A and Kai K (2017) Regulation Involved in Colonization of Intercellular Spaces of Host Plants in *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Plant Science** 8: 1–6.
- Jacobs JM, Babujee L, Meng F, Milling A and Allen C (2012) The *in planta* transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. **mBio** 3: e00114-12.

- Kai K, Ohnishi H, Shimatani M, Ishikawa S, Mori Y, Kiba A, Ohnishi K, Tabuchi M and Hikichi Y (2015) Methyl 3-Hydroxymyristate, a Diffusible Signal Mediating phc Quorum Sensing in *Ralstonia solanacearum*. **ChemBioChem** **16**: 2309–2318.
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology** **44**: 693–695.
- Kim BS, French E, Caldwell D, Harrington EJ and Iyer-Pascuzzi AS (2015) Bacterial wilt disease: Host resistance and pathogen virulence mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **95**: 37–43.
- Kim SG, Hur OS, Ro NY, Ko HC, Rhee JH, Sung JS, Ryu KY, Lee SY and Baek HJ (2016) Evaluation of resistance to *Ralstonia solanacearum* in tomato genetic resources at seedling stage. **Plant Pathology Journal** **32**: 58–64.
- Kim SH, Olson TN, Schaad NW and Moorman GW (2003) *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2, the Causal Agent of Brown Rot of Potato, Identified in Geraniums in Pennsylvania, Delaware, and Connecticut. **Plant Disease** **87**: 450–450.
- Kumar R, Barman A, Phukan T, Kabyashree K, Singh N, Jha G, Sonti R V., Genin S and Ray SK (2017) *Ralstonia solanacearum* virulence in tomato seedlings inoculated by leaf clipping. **Plant Pathology** **66**: 835–841.
- Lemessa F and Zeller W (2007) Pathogenic characterisation of strains of *Ralstonia solanacearum* from Ethiopia and influence of plant age on susceptibility of hosts against *R. solanacearum*. **Journal of Plant Diseases and Protection** **114**: 241–249.
- Lin Y-M, Chou I-C, Wang J-F, Ho F-I, Chu Y-J, Huang P-C, Lu D-K, Shen H-L, Elbaz M, Huang S-M and Cheng C-P (2008) Transposon mutagenesis reveals differential pathogenesis of *Ralstonia solanacearum* on tomato and *Arabidopsis*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** **21**: 1261–1270.
- Lopes CA, Boiteux LS and Eschemback V (2015) Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira** **33**: 219–222.
- Lopes CA, Quezado-Soares A and Melo P (1994) Differential Resistance of Tomato Cultigens to Biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease** **78**: 1091–1094.
- Macho AP, Guidot A, Barberis P, Beuzón CR and Genin S (2010) A Competitive Index Assay Identifies Several *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Mutant Strains with Reduced Fitness in Host Plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **23**: 1197–1205.
- Marchetti M, Capela D, Glew M, Cruveiller S, Chane-Woon-Ming B, Gris C, Timmers T, Poinot V, Gilbert LB, Heeb P, Médigue C, Batut J and Masson-Boivin C (2010) Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. **PLoS Biology** **8**.
- Mori Y, Inoue K, Ikeda K, Nakayashiki H, Higashimoto C, Ohnishi K, Kiba A and Hikichi Y (2016) The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. **Molecular plant pathology** **17**: 890–902.
- Peeters N, Guidot A, Vailleau F and Valls M (2013) *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. **Molecular Plant Pathology** **14**: 651–662.
- Peyraud R, Cottret L, Marmiesse L, Gouzy J and Genin S (2016) A Resource Allocation Trade-Off between Virulence and Proliferation Drives Metabolic Versatility in the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. **PLoS Pathogens** **12**: 1–25.
- Pradhanang PM, Elphinstone JG and Fox RTV (2000) Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. **Plant Pathology** **49**: 403–413.

- Puigvert M, Guarischi-Sousa R, Zuluaga P, Coll NS, Macho AP, Setubal JC and Valls M (2017) Transcriptomes of *Ralstonia solanacearum* during Root Colonization of *Solanum commersonii*. **Frontiers in Plant Science** 8.
- Remigi P, Capela D, Clerissi C, Tasse L, Torchet R, Bouchez O, Batut J, Cruveiller S, Rocha EPC and Masson-Boivin C (2014) Transient Hypermutagenesis Accelerates the Evolution of Legume Endosymbionts following Horizontal Gene Transfer. **PLoS Biology** 12.
- Singh N, Phukan T, Sharma PL, Kabyashree K, Barman A, Kumar R, Sonti R V., Genin S and Ray SK (2018) An Innovative Root Inoculation Method to Study *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity in Tomato Seedlings. **Phytopathology** 108: 436–442.
- Singh N and Siddiqui ZA (2012) Inoculation of Tomato with *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, and *Meloidogyne javanica*. **International Journal of Vegetable Science** 18: 78–86.
- Tran TM, MacIntyre A, Hawes M and Allen C (2016) Escaping Underground Nets: Extracellular DNases Degrade Plant Extracellular Traps and Contribute to Virulence of the Plant Pathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum*. **PLoS Pathogens** 12: 1–26.
- Vasse J, Genin S, Frey P, Boucher C and Brito B (2000) The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** 13: 259–267.
- Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L and Grimsley NH (2000) Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** 13: 6–13.
- Winsted NN and Kelman A (1952) Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology** 42: 628–634.

3. ANÁLISE DIALÉLICA PARA RESISTÊNCIA À MURCHA BACTERIANA EM TOMATEIRO

Resumo

Os programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de porta-enxertos de tomateiro resistentes à murcha-bacteriana, geralmente utilizam os biovars 1 e 3 do filótipo II de *Ralstonia solanacearum*, como principais alvos da seleção para resistência. Contudo, são raros os trabalhos de avaliação de genótipos e de suas combinações híbridas para resistência ao biovar 2 de *Ralstonia solanacearum*, o qual é extremamente agressivo e cuja ocorrência tem crescido nas áreas de cultivo de tomateiro no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar a heterose e capacidade de combinação entre linhagens de tomateiro com diferentes níveis de resistência à murcha-bacteriana, visando identificar cruzamentos promissores para gerar populações segregantes que permitam selecionar genótipos com resistência ao biovar 2 de *Ralstonia solanacearum*, por meio de inoculação artificial controlada. De forma adicional, tais genitores e cruzamentos foram avaliados em condições de solo naturalmente infestado com *Ralstonia* spp. Para o experimento de avaliação precoce, foi utilizado o isolado CNPH 488 (Biovar 2/Filótipo II) de *R. solanacearum*. Após a inoculação, as plântulas foram transferidas para vasos em estufa, sendo os sintomas avaliados do 5º ao 21º dia após a inoculação. Já no experimento de campo, as plantas foram transplantadas diretamente no solo contaminado, em canteiros cobertos com *mulching* plástico. Com base nestes estudos, foi possível concluir que somente o acesso Hawaii 7996 mostrou nível satisfatório de resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum*, sendo também aquele que apresentou a maior capacidade geral de combinação tanto no experimento de resistência por infecção controlada, quanto no experimento de avaliação de resistência à murcha-bacteriana em nível de campo. A combinação híbrida Hawaii 7996 x Rodade foi a única que apresentou valores positivos e relevantes para capacidade específica de combinação, no experimento de resistência por infecção controlada e no experimento de avaliação de resistência à murcha-bacteriana em nível de campo. Considerando que o acesso Hawaii 7996 apresentou expressiva capacidade geral e específica de combinação, em relação aos demais acessos avaliados nos estudos em questão, recomenda-se o mesmo como sendo um dos principais genitores para programas de melhoramento visando aumentar a resistência à murcha-bacteriana em tomateiro.

Palavras-chave: Análise dialélica; *Ralstonia* spp.; Resistência; *Solanum lycopersicum*

Abstract

Genetic breeding programs that aimed the development of bacterial wilt resistant tomato rootstocks generally use biovars 1 and 3 of *Ralstonia solanacearum* phylotype II as the main targets for resistance selection. However, evaluation of genotypes and their hybrid combinations for resistance to biovar 2 from *Ralstonia solanacearum*, which is extremely aggressive and whose occurrence has increased in tomato growing areas in Brazil. The objective of this work was to estimate heterosis and the combining ability of tomato lines with different levels of resistance to bacterial wilt, in order to identify promising crosses to generate segregant populations that allow the selection of genotypes with resistance to biovar 2 of *Ralstonia solanacearum*, for means of controlled artificial inoculation. Additionally, such parents and crosses were evaluated under conditions of soil naturally infested with *Ralstonia* spp. For the early evaluation experiment, isolate CNPH 488 (Biovar 2 / Phylotype II) of *R. solanacearum* was used. After inoculation, the seedlings were transferred to pots in a greenhouse, the symptoms being evaluated from the 5th to the 21st day after inoculation. In the field experiment, the plants were transplanted directly into the contaminated soil, in beds covered with plastic mulching. Based on these studies, it was possible to conclude that only Hawaii 7996 access showed a satisfactory level of resistance to *R. solanacearum* biovar 2 and it was also the one that presented the greatest overall combining ability in both the controlled infection resistance trial and in

the trial evaluation at the field level. The hybrid combination Hawaii 7996 x Rodade was the only one that presented positive and relevant values for specific combining ability at the controlled infection resistance experiment, and at the field-level bacterial wilt resistance experiment. Considering that Hawaii 7996 access had expressive general and specific combining ability, in relation to the other's evaluated in this study, it is recommended this genotype to be one of the main sources of resistance for breeding programs aiming to increase resistance to bacterial wilt in tomato.

Keywords: Diallel analysis; *Ralstonia* spp.; Resistance; *Solanum lycopersicum*

3.1. Introdução

Os problemas com a murcha-bacteriana em tomateiro têm aumentado bastante nas últimas cinco décadas, levando diversos pesquisadores a buscar por fontes de resistência para essa doença, tanto em acessos cultivados (*Solanum lycopersicum* var. *esculentum*) quanto em acessos silvestres (*Solanum* spp.) A resistência à murcha-bacteriana foi primeiramente relatada em *Solanum pimpinellifolium* PI 127805A (Acosta *et al.* 1964) e inúmeras fontes de resistência foram encontradas e tem sido estudadas desde então (Henderson and Jenkins 1972, Wang *et al.* 1996, Hanson *et al.* 1998, Sharma *et al.* 2002). Acredita-se que a resistência em cultivares comerciais originou-se de hibridações com *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ou *S. pimpinellifolium* (Prior *et al.* 1994). A maior parte da resistência em linhagens melhoradas e cultivares provavelmente foram derivadas de três acessos principais: PI127805A (*S. pimpinellifolium*) primeiramente identificada na Universidade do Havaí; CRA66 (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) encontrado por pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA-França), nas Antilhas Francesas; e PI129080 (*S. pimpinellifolium*), além de algumas fontes adicionais de resistência (Hanson *et al.* 1998), as quais geralmente são mais efetivas para biovars específicos da região onde foram identificadas. Uma colaboração internacional para avaliação de resistência à murcha-bacteriana determinou que a cultivar Hawaii 7996 contém o maior nível de resistência (Wang *et al.* 1998) dentre os acessos estudados. Acredita-se que PI 127805A é a principal fonte de resistência do acesso Hawaii 7996 (Rouamba *et al.* 1988, Mangin *et al.* 1999), porém ainda restam algumas dúvidas sobre suas origens (Scott *et al.* 2005).

A base genética da resistência à murcha-bacteriana tem sido estudada em diversos acessos que são fontes de resistência, sendo constatado que em geral a maioria dos acessos possui herança poligênica para esse caráter (Mangin *et al.* 1999). Contudo, há estudos pontuais que divergem quando à base poligênica da resistência à murcha em Hawaii 7998 e Hawaii 7996, sugerindo que a resistência destes acessos deve-se a um único gene dominante (SCOTT *et al.*, 1988; GRIMAULT *et al.*, 1995). A dominância relatada para a Hawaii 7998 e Hawaii 7996 não é generalizada para todas as fontes de resistência em todos os estudos. A resistência em *S. pimpinellifolium* é parcialmente dominante apenas no estado de plântula (Acosta 1972), enquanto a resistência em LA1421 (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) é recessiva completa (Mohamed *et al.* 1997). A resistência do acesso Hawaii 7996 tem sido analisada em diversos estudos, usando diferentes isolados e modelos quantitativos. Análises usando marcadores moleculares indicam um QTL (*Quantitative trait loci*) no cromossomo 6 associado com a resistência aos isolados da raça 1 do biovar 1 (Thoquet, *et al.* 1996) e Biovar 3 (Wang *et al.* 2000).

Análises de resistência para um isolado (raça 1, biovar 1 e filótipo II) em uma progênie derivada do cruzamento entre Hawaii 7996 x West Virginia 700, identificou um QTL no cromossomo 6, dois QTLs no cromossomo 4, e um QTL no cromossomo 10, todos os quais chegando a explicar entre 30 a 56% da variação fenotípica observada no acesso Hawaii 7996 (Thoquet, *et al.* 1996). Avaliações em campo da população derivada do

cruzamento Hawaii 7996 x West Virginia 700 com o isolado GMI8217 levaram à detecção de seis QTLs conferindo resistência à murcha-bacteriana (Thoquet, *et al.* 1996).

Estudos subsequentes desta população utilizando combinações de isolados sugerem que o QTL detectado no cromossomo 6 seriam, na verdade, dois QTLs ligados (Mangin *et al.* 1999). Estudos realizados por confirmaram que o QTL do cromossomo 6 no acesso Hawaii 7996 confere resistência ao isolado Pss4 (raça 1, biovar 3, filótipo 1). Eles também encontraram um *locus* específico associado à resistência a este isolado no cromossomo 12. Em outro estudo realizado por (Danesh, *et al.* 1994), foi identificado um QTL que confere resistência ao isolado UW364 (raça 1, biovar 3, filótipo 1), utilizando uma população derivada do cruzamento com o acesso L285 (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) resistente à murcha-bacteriana. Neste mesmo estudo, também foram identificados QTLs nos cromossomos 7 e 10, com algum nível de associação com a resistência à murcha.

Apesar da importância do QTL ou dos QTLs ligados no cromossomo seis que apareceram nos estudos envolvendo cruzamentos com o acesso Hawaii 7996 e Hawaii 7998, a importância de outros QTLs ou respostas específicas a alguns isolados não podem ser negligenciadas. Uma das principais e mais críticas questões que envolvem os estudos da herança da resistência à murcha-bacteriana em tomateiro é relacionada ao fato de que o patógeno é muito variável, havendo certa especificidade de respostas entre isolados e genótipos de tomateiro resistentes. Em outras palavras, é necessário que cada avaliação e cada estudo seja realizado nos locais ou macro regiões de ocorrência de murcha, utilizando isolados das próprias áreas, uma vez que, de forma geral, a resistência parece ser genótipo-específica.

Em relação à biologia do gênero *Ralstonia*, acreditava-se até as últimas décadas que as diferenças de agressividade e comportamento observadas entre isolados de *Ralstonia solanacearum* fossem devidas somente às próprias diferenças genéticas entre os mesmos. Contudo, (Safni *et al.* 2014) forneceram evidências para uma revisão na nomenclatura dos membros desse complexo, utilizando uma abordagem taxonômica e molecular em análises de um grande número de isolados. Neste trabalho, foi então proposto que a espécie *R. solanacearum* compreendia três geno-espécies distintas. A primeira espécie engloba somente o filótipo II de *R. solanacearum*, sendo sugerido que esta continuasse com a denominação de *Ralstonia solanacearum*. A segunda espécie compreende os filótipos I e III de *R. solanacearum*, os quais foram renomeados como *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov.

Já a terceira espécie, inclui isolados de *Ralstonia syzygii* e do filótipo IV de *R. solanacearum*, sendo sugerida a subdivisão em três grupos distintos nomeados: *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov. para o filótipo IV de *R. syzygii*, que é o agente causal da doença de Sumatra em árvores de cravo na Indonésia, *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. para o filótipo IV de *R. solanacearum* e *Ralstonia syzygii* subsp. *Celebesensis* subsp. nov. para o filótipo IV de BDB ou Doença Bacteriana do Sangue, o agente causal da doença do sangue da banana, uma murcha-bacteriana na Indonésia que afeta bananeiras.

Mais recentemente, outros autores (Prior *et al.* 2016), utilizando técnicas mais avançadas de análises genômicas em 29 isolados e análises proteômicas de 73 isolados, forneceram evidências que suportam a divisão proposta do complexo *Ralstonia* em três espécies distintas de (Safni *et al.* 2014). Portanto, a proposta das três geno-espécies de (Safni *et al.* 2014) ainda tem sido a classificação mais aceita e utilizada até o momento. Deste modo, fica evidente que *Ralstonia* spp. é um complexo de espécies com ampla variabilidade, para o qual espera-se respostas genótipo-específicas de resistência.

Em meio à complexidade das divisões em espécies raças, biovars e filótipos, é difícil vislumbrar estudos que possam abranger toda a diversidade de isolados e espécies de *Ralstonia* spp. que causam murcha em tomateiro. No cenário mais atual, é possível afirmar que em nível de Brasil e do mundo todo, a grande maioria dos estudos de

resistência foram realizados utilizando os biovars 1 e 3 do filótipo II de *Ralstonia solanacearum*, sendo que estes biovars ocorrem com mais frequência nas áreas de cultivo. Contudo, são raros os trabalhos com o biovar 2 de *Ralstonia solanacearum*, o qual é extremamente agressivo e cuja ocorrência tem crescido nas áreas de cultivo de tomateiro no Brasil. Há relatos informais de pesquisadores do setor público e privado de que mesmo os melhores híbridos de tomateiro utilizados como porta-exertos resistentes à murcha-bacteriana, tem apresentado quebra de resistência, tornando o cultivo do tomateiro impraticável em diversas áreas. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estimar a heterose e capacidade de combinação entre linhagens de tomateiro, visando identificar cruzamentos promissores para gerar populações segregantes que permitam selecionar genótipos com resistência à murcha-bacteriana causada pelo biovar 2 de *Ralstonia solanacearum*, por meio de inoculação artificial controlada, bem como avaliar tais genitores e cruzamentos em condições de solo naturalmente infestado com *Ralstonia* spp.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Material vegetal e hibridações

Para obtenção dos híbridos foram utilizadas cinco linhagens de tomate, sendo três conhecidas pela resistência à murcha-bacteriana (Hawái 7996, Rotam, Rodade), uma linhagem com relatos de resistência no leste asiático (Vietnamita) e uma suscetível (TPN-191), oriunda do banco de germoplasma de hortaliças do Departamento de Genética da ESALQ/USP. A descrição geral das características das linhagens utilizadas neste trabalho estão detalhadas no ANEXO.

Os cruzamentos foram realizados em casa de vegetação no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba, São Paulo, no período de fevereiro a junho de 2016. Os cruzamentos foram realizados em esquema de dialélico completo, sem os recíprocos, uma vez que em tomateiro já foi verificado que o efeito materno nesta espécie é nulo ou insignificante (Khanna and Chaudhary 1974). Foram então realizados todas as 10 combinações possíveis de cruzamentos entre pares, utilizando as cinco linhagens de tomateiro. Para realizar os cruzamentos, os botões florais das plantas receptoras de pólen foram emasculados dois dias antes do cruzamento, visando atingir o ponto adequado de maturação nos órgãos reprodutivos femininos e, consequentemente, maior probabilidade de fertilização e obtenção de sementes. As flores selecionadas para polinização apresentavam as pétalas esbranquiçadas ou esverdeadas, momento no qual o pólen está fortemente aderido às fendas verticais nas anteras, reduzindo riscos de possíveis autopolinizações. Após a completa maturação dos frutos (aproximadamente 60 dias após a polinização), eles foram colhidos e suas sementes extraídas.

3.2.2. Material microbiano para experimento de avaliação precoce de resistência à murcha-bacteriana

Quanto ao material bacteriano, foi utilizado o isolado de *Ralstonia solanacearum* (tabela 3), gentilmente cedido pelo Doutor Carlos Alberto Lopes da Embrapa Hortaliças (Brasília, Distrito Federal). Foram realizados testes preliminares de inoculação deste isolado, após multiplicação e obtenção dos estoques bacterianos, a fim de verificar a manutenção de sua virulência em plantas de tomateiro e excluir possíveis contaminações.

Tabela 3. Isolado de *Ralstonia solanacearum* utilizado na inoculação de plântulas de tomateiro

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Procedência	Biovar/Filótipo	Ano de Isolamento
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNPH 488	Tomate	Grandes Rios – PR	2/II	2012

3.2.3. Inoculação de *Ralstonia solanacearum* em plântulas de tomateiro

Para realizar a inoculação de *R. solanacearum*, as sementes das linhagens e híbridos de tomateiro foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células contendo fibra de coco (Golden Mix®, Amafibra) como substrato. A irrigação foi realizada três vezes ao dia por 5 minutos para correta disponibilização de água e para evitar seu acúmulo excessivo. Após a germinação, as mudas foram adubadas em dias alternados com o adubo solúvel Peter's Professional 20-20-20 (Everris® Peter's). Uma vez obtidas as plântulas em estágio adequado para realizar a inoculação das mesmas, procedeu-se o preparo da suspensão bacteriana.

A partir de estoques mantidos em freezer -80 °C, o isolado CNPH 488 (Biovar 2/Filótipo II) de *R. solanacearum* foi plaqueado em meio Kelman (Kelman 1954), permanecendo por 48 horas a 28 °C em BOD. Frações das colônias típicas do patógeno foram adicionadas em meio Kelman líquido e permaneceram crescendo em agitador por mais 24 horas a 28 °C em rotação de 80 rpm. Em seguida os inóculos foram diluídos em água estéril e, com o auxílio de um espectrofotômetro, a suspensão bacteriana foi ajustada para uma densidade óptica de equivalente a 10⁸ UFC/mL (OD_{600nm} = 0,3) (Hanson *et al.* 1998, Wang *et al.* 2000). A inoculação das plântulas do experimento foi realizada quando as plantas apresentaram duas folhas completamente desenvolvidas (aproximadamente 30 dias após a semeadura), utilizando o método da lesão das raízes no torrão com objeto cortante (bisturi) e pulverização de 5 mL da suspensão bacteriana neste mesmo torrão.

Após a inoculação, as mudas foram incubadas em câmara úmida a 85% de umidade relativa, com temperatura de 30-32 °C durante o dia, e 25-27 °C durante a noite, com foto-período de 12 horas, durante 48 horas. Após esse período, as plantas foram transplantadas em casa de vegetação para vasos de 10 litros contendo substrato comercial Basaplant®. A irrigação por aspersão foi ajustada para seis vezes ao dia por cinco minutos e com controle do aquecimento noturno de forma a evitar que a temperatura diminuísse a valores inferiores a 20 °C.

O experimento foi realizado em blocos casualizados, sendo as parcelas compostas de seis vasos de 10 litros de substrato, contendo quatro plantas por vaso, inoculadas com o isolado bacteriano. A nota de severidade da doença consistiu em uma média da parcela. As avaliações foram realizadas através do sistema proposto por Winsted and Kelman (1952), no qual as observações dos sintomas ocorreram do 5º ao 21º dia após a inoculação. A escala de notas utilizada para a análise da doença foi a seguinte:

- 1: Sem sintomas;
- 2: Uma folha murcha;
- 3: Duas a três folhas murchas;
- 4: Quatro ou mais folhas murchas;
- 5: Toda a planta murcha (planta morta).

O cálculo da intensidade da murcha em 21 dias após a inoculação foi realizado usando a seguinte equação:

$$I = \left[\sum \frac{(n_i x v_i)}{(V x N)} \right] 100$$

Onde:

I = Intensidade de murcha (%);

n_i = número de plantas com o respectivo índice de doença;

v_i = índice da doença (1, 2, 3, 4 ou 5);

V = maior índice de doença (5);

N = número de plantas observadas.

Contudo, para criar uma associação mais direta da escala dos valores visando a obtenção das estimativas de heterose, CGC e CEC, será utilizado um índice de resistência à murcha (R), o qual será mencionado genericamente como Resistência ao longo do texto, considerando que $R = 100 - I$.

3.2.4. Avaliação de resistência à murcha-bacteriana em área de campo naturalmente infestada com *Ralstonia* spp.

A avaliação dos genitores e dos híbridos foi realizada em uma área com alta infestação de *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, São Paulo. Os genótipos foram avaliados em seu potencial para uso como porta-enxertos, visando aumentar a resistência em nível de campo à murcha-bacteriana. Para tanto, a produção das mudas e a enxertia foram realizadas no viveiro comercial de mudas da Hidroceres Comercial Agrícola LTDA (Santa Cruz do Rio Pardo – SP). Foi utilizado como copa o híbrido Gabryelle gentilmente fornecido pela empresa Hazera Seeds do Brasil. O híbrido Gabryelle apresenta crescimento determinado, fruto tipo saladete alongado, firme, com alta uniformidade, resistente ao TYLCV (Geminivírus) e TSWV (Vira-cabeça).

Para a realização deste experimento foram feitos canteiros, com o uso de um encanteirador, espaçados de 1,80 m entre si (entre linhas), os quais foram cobertos com *mulching* plástico preto (filme plástico). Os experimentos foram instalados em blocos ao acaso com 15 tratamentos e três repetições, totalizando 45 parcelas experimentais. Cada parcela foi constituída por seis plantas úteis, espaçadas em 0,40 m entre plantas na parcela.

O manejo do experimento foi semelhante ao de uma cultura comercial para produção de tomate. A condução do experimento foi em sistema de tutoramento de meia estaca, sendo cada planta conduzida individualmente e os brotos retirados até o aparecimento do primeiro cacho floral. A adubação de base foi realizada de acordo com o recomendado após a análise do solo, e a irrigação e a fertirrigação foram fornecidas via sistema de gotejamento. O controle de doenças e pragas foi realizado conforme as necessidades da cultura. A resistência ao nível de campo foi baseada na avaliação dos percentuais de taxas de sobrevivência das plantas nas parcelas.

3.2.5. Análises estatísticas

Inicialmente, foi realizada uma comparação geral dos resultados de resistência e sobrevivência, considerando o total de 15 tratamentos (5 linhagens e 10 híbridos). A análise dos dados foi realizada usando o programa R, versão 3.2.3 (R CORE TEAM, 2017). A análise de variância univariada foi realizada de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + b_j + g_i + e_{ij}$$

Em que:

y_{ij} : valor da observação do genótipo i , no bloco j ;

μ : é a constante comum a todos os genótipos;

g_i : efeito do genótipo i , sendo $i = 1, \dots, i$;

b_j : efeito do bloco j , sendo $j = 1, \dots, j$;

e_{ij} : efeito do resíduo experimental do genótipo i , no bloco j .

A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

3.2.6. Análise da capacidade de combinação

As análises dialélicas foram realizadas pelo método 2, modelo 1 (fixo) proposto por (Griffing 1956), envolvendo genitores e híbridos, a partir dos quais foram estimadas a Capacidade Geral de Combinação (CGC) das linhagens genitoras e as Capacidades Específicas de Combinação (CEC) dos pares de cruzamentos. Para estimar a capacidade geral e específica de combinação, as análises de variância foram realizadas conforme o modelo estatístico a seguir:

$$y_{ij} = \mu + g_i + g_j + s_{ij} + e_{ij}$$

Onde:

y_{ij} : valor médio da combinação híbrida ($i \neq j$) ou do progenitor ($i=j$);

μ : é uma constante inerente a todas as observações (média geral);

g_i e g_j : efeitos da capacidade geral de combinação do i -ésimo e do j -ésimo progenitor, respectivamente;

s_{ij} : efeito da capacidade específica de combinação para os cruzamentos entre os progenitores de ordem i e j , considerado que $s_{ij} = s_{ji}$;

e_{ij} : erro experimental médio.

As estimativas de CGC e CEC foram obtidas utilizando o programa R (R Core Team 2017) com auxílio do pacote Diallel Analysis (Yaseen 2016).

3.2.7. Estimativa das Heteroses

Os valores da heterose dos 10 híbridos foram obtidos a partir de sua relação com a média dos genitores, de acordo com a metodologia tradicional descrita em (Venkovsky and Barriga 1992). A heterose dos híbridos, em porcentual, foi calculada em relação à média dos genitores (H_m) e em relação ao genitor superior (H_g):

$$H_m(\%) = 100 \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}}{\bar{P}}$$

$$H_g(\%) = 100 \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}_s}{\bar{P}_s}$$

Sendo que, $\bar{F}_1$ é a média de resistência dos híbridos, $\bar{P}$ é a média de resistência dos genitores e $\bar{P}_s$ é a média de resistência do genitor superior.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Avaliação precoce de resistência ao biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro

Plantas com sintomas de murcha-bacteriana foram verificadas em todos os genitores e híbridos do experimento, demonstrando que nenhum genótipo é imune ao isolado de *R. solanacearum* biovar 2. A ocorrência de plantas resistentes apresentando sintomas de murcha é um fato comum tanto nos cultivos comerciais, quanto nos trabalhos acadêmicos. Quando são utilizados porta-exertos resistentes à murcha-bacteriana em cultivos comerciais, parte dos escapes de resistência devem-se à contaminação, via região da enxertia, das plantas susceptíveis usadas como copa; e outra parte se deve à própria quebra ou superação da resistência pelos isolados endêmicos da área. Por esse motivo, alguns pesquisadores descrevem a resistência à *Ralstonia* spp. mais como sendo uma tolerância do que resistência (Prior *et al.* 1994, Thoquet, *et al.* 1996), embora estes conceitos frequentemente se confundam, sendo usual adotar o termo resistência de forma genérica em ambos os casos. O resumo da análise de variância (tabela 4) mostrou que foram identificados efeitos significativos para diferenças na resistência o biovar 2 de *R. solanacearum*, para os genitores, híbridos e para o contraste entre genitores e híbridos.

Tabela 4. Resumo da análise de variância para a resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum* em tomateiro, em experimento de inoculação artificial controlada

F.V.	G.L.	Quadrados Médios
Blocos	3	95,03.
Genótipos	14	1247,72**
Linhagens (L)	4	3080,55**
Híbridos (H)	9	532,99**
L x H	1	348,97**
Resíduo	28	29,55
Média		12,15
C.V. (%)		44,74

., *, **, ns: significativo a 10%, 5%, 1% e não significativo, respectivamente, pelo teste F

O coeficiente de variação observado de 44,74%, embora considerado alto, é comum devido à natureza da variação dos dados, que são baseados em percentuais relativos aos níveis de sintomas e sobrevivência das plantas. Ou seja, tal magnitude de variação era esperada neste estudo em questão. Dentre os genitores, apenas Hawaï 7996 teve um nível de resistência razoável ao biovar 2 de *R. solanacearum*, com 73,35% de sobrevivência das plantas inoculadas (tabela 5). Os outros genitores apresentaram quase 100% de plantas mortas, o que mostra o nível elevado de agressividade deste biovar 2. O nível de resistência entre os cruzamentos variou de 0,00% até 44,17%, sendo que os valores mais elevados foram observados nos cruzamentos com a Hawaï 7996 e Rodade. Entre os cruzamentos, a menor incidência de murcha-bacteriana ocorreu na combinação Rodade x Hawaï 7996 (44,17% de resistência), sendo estes os genitores que mais se destacaram nas combinações com outros genitores, no que diz respeito ao incremento em resistência. Nos demais cruzamentos, nenhum apresentou nível de resistência satisfatório (tabela 5).

Em princípio, a expectativa era de que os níveis de resistência fossem maiores tanto nos genitores quando nos cruzamentos, pois os acessos Hawaï 7996, Rotam e Rodade estão entre as principais fontes de resistência à murcha-bacteriana mencionadas em trabalhos acadêmicos derivados de pesquisas no exterior. Contudo, dentre estes genitores, somente Hawaï 7996 foi capaz de prover resultados satisfatórios. Quanto ao acesso Vietnamita, também reportado como resistente à murcha, apresentou comportamento similar ao acesso TNP191, que seria a referência de susceptibilidade neste estudo, o que indica uma provável especificidade do acesso Vietnamita para resistência aos isolados de sua região de origem, tendo efeito praticamente nulo no incremento de resistência ao isolado testado neste trabalho.

Tabela 5. Comparação de médias do nível de resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum*, entre genitores e híbridos de tomateiro

Genótipo	Resistência (%)	
Rotam	3,06	c
Rodade	3,78	c
Vietnamita	0,28	c
Hawaii 7996	73,34	a
TPN191	0,00	c

Rotam x Rodade	0,00	c
Rotam x Vietnamita	2,50	c
Rotam x Hawaii 7996	9,17	c
Rotam x TPN191	0,00	c
Rodade x Vietnamita	10,00	c
Rodade x Hawaii 7996	44,17	b
Rodade x TPN191	5,00	c
Vietnamita x Hawaii 7996	16,39	c
Vietnamita x TPN191	0,42	c
Hawaii 7996 x TPN191	14,17	c

Média Genitores	16,09	A
Média Cruzamentos	10,18	B

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de tukey a 5% de probabilidade de erro

Como objetivo de verificar o desempenho das combinações híbridas em relação aos genitores, foram estimadas as heteroses para cada par de cruzamentos (tabela 6). Em relação à heterose foram encontrados valores positivos e negativos, nos quais os valores negativos significam desempenho (resistência) menor que a média dos genitores e valores positivos indicam desempenho maior que a média dos genitores. Dentre os cruzamentos estudados, vale notar que Rotam x Rodade e Rotam x TPN191 apresentaram valores de H_{mg} e H_{gs} de -100,00%, indicando que esses cruzamentos foram igual a zero.

Na abordagem realizada neste trabalho, as estimativas de heterose podem levar algum viés de interpretação. Os cruzamentos entre Rotam x Vietnamita, Rodade x Vietnamita, Rodade x Hawaii 7996, Rodade x TPN191 e Vietnamita x TPN191, apresentaram valores positivos e em sua maioria relativamente elevados de

heterose. Contudo, é preciso ficar claro que os níveis de resistência tanto nas linhagens como nos cruzamentos mostram valores baixos, o que leva a valores elevados de heterose em percentual. O único efeito de heterose que merece atenção vem da combinação entre Rodade x Hawaii 7996 (14,55%), o qual embora com valor baixo, foi aquele que apresentou média mais alta de nível de resistência. Contudo, tal cruzamento não foi capaz de superar o melhor genitor (Hawaii 7996), mostrando valor negativo para H_{gs} (-39,77%). Já com relação aos demais cruzamentos em que H_{gs} foi positivo, pode-se considerar que na prática sua importância seria reduzida ou nula, uma vez que as médias de resistência nestes casos foram extremamente baixas. Assim, alguns desvios positivos de H_{gs} provenientes de tais cruzamentos, seriam provavelmente devidos ao aumento de vigor das plantas nas combinações híbridas, cujo aparente incremento em resistência não estaria associado diretamente ao potencial genético específico para a resistência à murcha-bacteriana.

Tabela 6. Percentual de heterose em relação à média dos genitores (H_{mg}) e ao genitor superior (H_{gs}), para resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum* em tomateiro

Cruzamentos	H_{mg}	H_{gs}
Rotam x Rodade	-100,00	-100,00
Rotam x Vietnamita	49,70	-18,30
Rotam x Hawaii 7996	-75,99	-87,50
Rotam x TPN191	-100,00	-100,00
Rodade x Vietnamita	392,61	164,55
Rodade x Hawaii 7996	14,55	-39,77
Rodade x TPN191	164,55	32,28
Vietnamita x Hawaii 7996	-55,47	-77,65
Vietnamita x TPN191	200,00	50,00
Hawaii 7996 x TPN191	-61,36	-80,68

Embora a média de resistência da maior parte dos cruzamentos tenha sido reduzida, é possível observar que alguns genitores foram capazes que elevar, mesmo que discretamente, os níveis de resistência de genitores mais susceptíveis, em determinadas combinações híbridas. Isso pode refletir, de forma geral, uma maior quantidade de alelos favoráveis que poderiam ter importância para melhoramento visando aumentar a resistência à murcha-bacteriana em tomateiro. Assim, a (tabela 7) mostra que foram identificados efeitos significativos tanto para a Capacidade Geral de Combinação (CGC) quanto para a Capacidade Específica de Combinação (CEC) entre os genitores.

Tabela 7. Resumo da análise de variância das estimativas da Capacidade Geral de Combinação e Capacidade Específica de Combinação, para resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum* em tomateiro

F.V.	G.L.	Quadrados Médios
C.G.C.	4	1165,25**
C.E.C.	10	116,16**
Resíduo	28	9,85

** : significativo a 1% pelo teste F

A capacidade geral de combinação é utilizada para designar o comportamento médio de um genitor em todos os cruzamentos em que o mesmo participa (Sprague and Tatum 1942, Venkovsky and Barriga 1992). Já a capacidade específica de combinação é utilizada para estimar quais combinações híbridas tem um desempenho relativamente melhor ou pior do que o esperado, com base na performance média dos genitores envolvidos (Sprague and Tatum 1942). Valores baixos na estimativa da CGC de um genitor, obtida com base nas suas hibridizações com os outros genitores, indica que a sua CGC não difere muito da média geral dos genitores do dialelo. Por outro lado, quanto maiores forem as estimativas de CGC, tanto positivas quanto negativas, existe uma indicação de que o genitor estudado tem uma capacidade geral de combinação muito superior ou inferior aos demais genitores do cruzamento dialélico (Cruz *et al.* 2012).

Neste estudo, a superior magnitude dos quadrados médios da CGC sobre a CEC sugere que, para esse grupo de genitores testados com o isolado da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum*, a resistência à murcha-bacteriana é dada, em grande, parte pelo componente aditivo. Resultados similares a estes foram reportados por (Gonzalez and Summers 1995, Hanson *et al.* 1998), para os biovars 1 e 3 de isolados do leste asiático, o qual relatou a importância relativa do componente genético aditivo na resistência aos os referidos biovars.

Pelo efeito da CGC pode-se verificar na (tabela 8) que os genitores Hawaï 7996 e Rodade, que possuem as maiores médias de resistência, apresentaram efeitos positivos, sendo que o valor da CGC foi relativamente elevado para Hawaï 7996, ao passo que o valor para Rodade ficou próximo de zero. Já as CGCs dos demais genitores apresentaram valores negativos indicando que, em média, a resistência à murcha causada pelo biovar 2 de *R. solanacearum* é menor nos cruzamentos utilizando tais genitores.

Tabela 8. Estimativas do efeito da capacidade geral de combinação (CGC) dos genitores, para resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum* em tomateiro

Genitores	Resistência (%)
Rotam	-9,20
Rodade	0,44
Vietnamita	-6,23
Hawaï 7996	19,30
TPN191	-8,23
D.P.	11,84

As estimativas de CGC proporcionou a identificação de qual genitor seria superior para o caráter de resistência à murcha-bacteriana. Contudo, é importante agora verificar o efeito da CEC, a qual provê informações sobre o desvio de um híbrido em relação ao que seria esperado com base na CGC de seus genitores. Com isso, a estimativa da CEC deve contribuir para identificar cruzamentos biparentais que tenham maior potencial para o desenvolvimento de populações de melhoramento para a resistência à murcha-bacteriana.

Utilizando ao método 2 de Griffing (1956), foi possível estimar tanto os efeitos da CEC do genitor com ele com mesmo (s_{ii}), como os efeitos da CEC entre genitores (s_{ij}). A capacidade específica de combinação, é importante além de levar em conta a s_{ij} , que diz respeito à complementaridade dos genitores, também a s_{ii} , pois ela é uma indicativa da divergência genética do genitor, em relação aos outros. Quanto maior a divergência, maior será a contribuição do genitor para a heterose de seus híbridos. Nas estimativas que s_{ii} é nulo ou próximo da nulidade, a divergência do genitor em questão em relação aos outros é pequena e a heterose também é pequena. Sendo assim, para a avaliação dos melhores híbridos, é preciso levar em conta tanto as estimativas de CGC (g_i) e CEC (s_{ij}), e deve-se manter atenção para as estimativas de CEC (s_{ii}). (Cruz *et al.* 2012).

Tabela 9. Estimativas do efeito da capacidade específica de combinação (s_{ii}) de cada genitor com ele próprio, para resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum* em tomateiro

Genitores	Resistência (%)
Rotam	-7,87
Rodade	-3,39
Vietnamita	4,88
Hawaii 7996	-12,14
TPN191	-12,89
D.P.	7,30

Uma vez que foram observados efeitos significativos da CEC entre os genitores, é importante conhecer quais combinações híbridas foram mais importantes na complementação entre os genótipos, com relação ao incremento de resistência à murcha-bacteriana em tomateiro. Neste estudo, o maior valor positivo de CEC foi encontrado para o cruzamento Rodade x Hawaii 7996, cujos genitores foram também aqueles que apresentaram valores positivos para CGC e, também, certo percentual de heterose. O genitor Hawaii 7996 apresentou valor negativo elevado da estimativa de s_{ii} ($s_{ii} = -12,14$) e provavelmente é o mais distante geneticamente entre os genitores para os genes de resistência à murcha-bacteriana, o que não necessariamente resultou em valores elevados de heterose nos cruzamentos envolvendo esse genótipo. Além disso, vale a pena notar que o genitor TNP191 foi aquele apresentou maior de $s_{ii} = -12,89$, o que é coerente, pois este é o único genótipo que não possui resistência à murcha, o que torna bastante divergente dos demais, proporcionando valores muito elevados de heterose quando combinados com os genitores mais divergentes (Vietnamita e Rodade), ainda que as médias de tais combinações híbridas tenham sido bastante reduzidas.

Os efeitos da capacidade específica de combinação entre genitores (s_{ij}) ressalta a importância de interações não aditivas na complementação gênica dos cruzamentos, possibilitando prever respostas de ganho genético com a exploração da heterose. A variância da capacidade específica de combinação inclui a totalidade da variância de

dominância e o remanescente dos efeitos de epistasia (Bastos, et al., 2003). Assim, como foi visto anteriormente que os efeitos predominantes nesse caso são de aditividade, embora a CEC tenha sido significativa, ela não foi tão importante quanto a CGC, pois as médias de resistência dos cruzamentos foram reduzidas.

Na (tabela 10), podemos ver os efeitos da CEC entre genitores (s_{ij}), evidenciando que os cruzamentos com maiores efeitos positivos de CEC foram Rodade x Hawaii 7996, Rotam x TPN191, Rotam x Vietnamita e Rotam x Rodade. Contudo, quando levamos em consideração a média do nível de resistência dos cruzamentos, nota-se que a combinação Rodade x Hawaii 7996 foi a mais importante, havendo razoável complementação para a resistência entre estes genitores.

Tabela 10. Estimativas do efeito da capacidade específica de combinação (s_{ij}) entre genitores, para resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum* em tomateiro

Cruzamentos	Resistência (%)
Rotam x Rodade	0,88
Rotam x Vietnamita	6,15
Rotam x Hawaii 7996	-22,52
Rotam x TPN191	7,62
Rodade x Vietnamita	-4,37
Rodade x Hawaii 7996	17,63
Rodade x TPN191	-3,34
Vietnamita x Hawaii 7996	-10,38
Vietnamita x TPN191	-1,35
Hawaii 7996 x TPN191	-2,03
D.P.	10,78

Uma vez que quatro (Rotam, Rodade, Hawaii 7996 e Vietnamita) dos cinco genitores foram previamente caracterizados como sendo resistentes à murcha-bacteriana, esperava-se que as médias de resistência dos cruzamentos entre tais genitores fossem mais elevadas. Contudo, é preciso levar em consideração a alta agressividade do biovar 2 de *R. solanacearum* que foi utilizado para o experimento de indução de murcha. De forma geral, duas situações ficaram muito evidentes com base nestes resultados, sendo que, dentre os acessos avaliados, somente um deles (Hawaii 7996) possui algum nível de resistência significativo para o biovar 2 de *R. solanacearum*, o que é bastante preocupante, dado o avanço do mesmo nas regiões de cultivo; e embora o cruzamento entre Hawaii 7996 x Rodade não tenha superado a média do genitor Hawaii 7996, houve algum efeito de heterose e boa CEC entre o mesmos, havendo potencial para avançar com seleções visando a obtenção de linhagens resistentes. A principal vantagem neste último caso seria complementação de outros genes de resistência, uma vez que Hawaii 7996 possui somente resistência à murcha verticilium (*Ve*), ao passo que a Rodade possui resistência à murcha de fusarium (*I-1* e *I-2*), que são doenças fúngicas de solo, havendo então a possibilidade de selecionar plantas resistentes à murcha-bacteriana, murcha de verticilium e murcha de fusarium, além de agregar maior tamanho aos frutos vindo do genitor Rodade (dados não apresentados).

Neste estudo, utilizando a inoculação e avaliação precoce do biovar 2 de *R. solanacearum*, foi possível confirmar a alta agressividade do mesmo, além do cenário preocupante quanto à quantidade de fontes de resistência

disponíveis para o desenvolvimento de genótipos resistentes à este biovar. Por outro lado, considerando que os percentuais de mortalidade das plantas foram muito elevados, não foi possível estimar se haveria algum efeito de incremento em resistência à murcha-bacteriana, sob condições de solo naturalmente infestado. Por esse motivo, as cinco linhagens e 10 híbridos de tomateiro, foram avaliados como porta-enxertos de um híbrido comercial susceptível à murcha-bacteriana, em uma área com elevado e uniforme nível de infestação por *Ralstonia* spp.

3.3.2. Avaliação da resistência à murcha-bacteriana em tomateiro em de solo infestado com *Ralstonia* spp.

Com o objetivo de complementar a avaliação precoce de resistência à murcha-bacteriana nas linhagens e híbridos deste estudo, foi instalado um experimento em área naturalmente contaminada com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP (figura 2). Embora seja possível imaginar que haja um biovar predominante na área, descartes de plantas, substrato e solos contaminados com os três biovars importantes de *Ralstonia* spp., tem sido depositados e distribuídos neste solo, de modo a tornar essa área estratégica para os estudos aqui apresentados. Por esse motivo, para este experimento, será feita referência à murcha causada por *Ralstonia* spp. de maneira geral, não levando-se em conta a espécie e/ou biovar predominante. De certa forma, este experimento simula a situação real nas áreas agrícolas com problemas de ocorrência de murcha-bacteriana, para as quais quase nunca há informações sobre a predominância de biovars ou sobre a ocorrência de infecções mistas de *Ralstonia* spp.

Figura 2. Visão geral do experimento de avaliação de resistência à murcha-bacteriana em área infestada com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Detalhe das diferenças no nível de sobrevivência das plantas com 45 dias após o transplante, nas parcelas com genótipos mais resistentes e mais susceptíveis à *Ralstonia* spp.

Neste experimento, foi avaliada a taxa sobrevivência das plantas ao final do ciclo cultural, expressa em percentual de plantas sobreviventes, aos 85 dias após o transplante. Na (tabela 11), é apresentado um resumo da análise de variância para os percentuais de sobrevivência (SOB) dos genótipos avaliados neste estudo. Neste caso, os maiores percentuais de sobrevivência refletem maior nível de resistência, assumindo que neste caso ambos os termos possuem praticamente o mesmo significado. Na (tabela 11), é possível observar que existem diferenças entre genótipos, linhagens e híbridos, quanto aos percentuais de SOB à murcha-bacteriana em campo.

Tabela 11. Resumo da análise de variância para sobrevivência à *Ralstonia* spp. em tomateiro

F.V.	G.L.	SOB
Blocos	3	465,30.
Genótipos	14	1536,59**
Linhagens (L)	4	3610,70**
Híbridos (H)	9	489,80*
L x H	1	2633,30**
Resíduo	28	165,02
Média		21,77
CV		0,5901

., *, **, ns: significativo a 10%, 5%, 1% e não significativo, respectivamente, pelo teste F

Uma visão geral dos percentuais médios de SOB para os genitores e híbridos é apresentada na (tabela 12). Diferentemente em relação ao que foi observado no teste de inoculação do biovar 2 de *R. solanacearum* nas plântulas dos genitores e híbridos de tomateiro, os percentuais de sobrevivência à murcha em nível de campo infestado com o patógeno foram mais elevados. O genitor mais resistência na avaliação precoce Hawaii 7996, foi aquele que apresentou a maior taxa de sobrevivência (88,86%) de plantas ao final do ciclo da cultura. Outro fato importante, foi a constatação dos níveis intermediários de resistência dos genitores Rotam (38,87%) e Rodade (20,00%), confirmando a caracterização como fontes de alelos de resistência à murcha-bacteriana, mesmo que não tão eficientes quanto a Hawaii 7996.

Já o genitor Vietnamita, apresentou comportamento tão susceptível quanto o TPN191, confirmando que tal genótipo deve ter importância mais específica para os isolados do Vietnã, cujas condições de solo e ambiente são diferentes das condições do Brasil. Com base neste estudo, envolvendo tanto a inoculação artificial quanto a avaliação em nível de campo, fica evidente que Vietnamita não deve ser considerado como fonte de genes de resistência para os biovars de *Ralstonia* spp. existentes no Brasil.

Tabela 12. Comparação das médias de sobrevivência à *Ralstonia* spp., entre genitores e híbridos de tomateiro

Genótipos	SOB	
Rotam	38,87	bc
Rodade	20,00	bc
Vietnamita	5,55	c
Hawaï 7996	88,86	a
TPN191	5,55	c
Rotam x Rodade	6,66	c
Rotam x Vietnamita	5,55	c
Rotam x Hawaï 7996	22,21	bc
Rotam x TPN191	11,11	bc
Rodade x Vietnamita	5,55	c
Rodade x Hawaï 7996	50,00	ab
Rodade x TPN191	22,21	bc
Vietnamita x Hawaï 7996	27,77	bc
Vietnamita x TPN191	0,00	c
Hawaï 7996 x TPN191	16,66	bc
Médias Genitores	31,77 A	
Médias Cruzamentos	16,77 B	

Nas combinações híbridas entre os genitores, nenhuma chegou a superar a Hawaï 7996 em percentual de SOB de plantas no campo. No entanto, o cruzamento entre Hawaï 7996 x Rodade foi aquele que apresentou o maior percentual de SOB de plantas no campo, de forma similar ao que ocorreu no experimento de avaliação de resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum*, reforçando a hipótese de que esta seria uma boa combinação entre genitores para gerar populações segregantes.

Em relação às heteroses, não foi verificado nenhum efeito expressivo em relação à média dos cruzamentos, evidenciando que praticamente não existe heterose para resistência em nível de campo, com exceção ao cruzamento TPN191 x Rodade, o qual apresentou valores mais elevados de heterose em relação à média dos pais e em relação ao genitor superior. Contudo, tal efeito positivo de heterose vem acompanhado de reduzido percentual de SOB no campo, das plantas oriundas deste cruzamento.

Tabela 13. Percentual de heterose em relação à média dos genitores (H_{mg}) e ao genitor superior (H_{gs}), para resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia spp.* em tomateiro

Cruzamentos	H_{mg}	H_{gs}
Rotam X Rodade	-77,35	-82,85
Rotam X Vietnamita	-75,00	-85,71
Rotam X Hawaii 7996	-65,22	-75,00
Rotam X TPN191	-50,00	-71,43
Rodade X Vietnamita	-56,54	-72,23
Rodade X Hawaii 7996	-8,14	-43,74
Rodade X TPN191	42,82	11,07
Vietnamita X Hawaii 7996	-100,00	-100,00
Vietnamita X TPN191	-100,00	-100,00
Hawaii 7996 X TPN191	-64,71	-81,25

Para a análise dialélica, a soma de quadrados de genótipos foi desdobrada em soma de quadrados para capacidade geral de combinação (CGC) e para capacidade específica de combinação (CEC) conforme o método 2 de Griffing (1956), tal como realizado para o experimento de avaliação precoce. Os quadrados médios associados à capacidade geral e capacidade específica de combinação estão na (tabela 14) abaixo. Os efeitos observados para CGC e CEC foram significativos tanto para CGC quanto para CEC. Isso indica que tanto efeitos gênicos aditivos como não-aditivos estão envolvidos no controle da resistência *Ralstonia spp.*, presente nessa área naturalmente infestada.

Alguns híbridos no experimento tiveram desempenho superior ao que se esperava. Quando um híbrido se comporta de tal maneira, isso indica a existência de efeitos não aditivos ou de dominância. Porém, nesse experimento, devido ao alto coeficiente de variação, esse desempenho superior dos híbridos pode ter ocorrido devido ao escape da infecção natural pelas bactérias e não devido à manifestação da resistência. Tal fato pode ter interferido nos estimadores obtidos nas análises genético-estatísticas.

Tabela 14. Resumo da análise de variância de Capacidade Geral de Combinação e Capacidade Específica de Combinação, para resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia spp.* em tomateiro

F.V.	G.L.	Quadrados Médios
CGC	4	1365,93**
CEC	10	206,11**
Resíduo	28	55,01

** : significativo a 1%, pelo teste F

Em relação às estimativas da CGC, os resultados também foram muito semelhantes aos obtidos nos teste de resistência precoce ao biovar 2 de *R. solanacearum*. Os efeitos da CGC de cada genitor permite afirmar que há comportamento diferencial entre eles em relação à resistência à murcha-bacteriana. As estimativas dos efeitos da

capacidade geral de combinação proporcionam informações sobre a concentração de genes de efeitos aditivos. Portanto, os genitores com estimativas de CGC altas e positivas são os que mais contribuem para o aumento da expressão do caráter, enquanto aqueles com valores altos e negativos contribuem com a redução de sua manifestação. Esses efeitos indicam a importância dos genes de efeitos predominantemente aditivos (SPRAGUE & TATUM, 1942). Deste modo, o genitor Hawaï 7996, que apresenta os maiores valores da estimativa da CGC, seria o mais favorável para uso em programas de melhoramento para resistência à murcha-bacteriana.

Tabela 15. Estimativas dos efeitos da capacidade geral de combinação (CGC) dos genitores, para resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia* spp. em tomateiro

Genitores	Sobrevivência (%)
Rotam	-4,89
Rodade	-0,89
Vietnamita	-18,44
Hawaï 7996	13,77
TPN191	-10,67
D.P.	12,03

As estimativas dos efeitos da CEC (s_{ii} e s_{ij}) encontram-se nas (tabelas 16 e 17). Foram observados valores de s_{ij} positivos e negativos em relação aos genitores. Como já mencionado anteriormente, as estimativas de s_{ii} são indicativas da divergência genética dos genitores em relação ao caráter em estudo em relação aos outros do dialelo. Normalmente quanto maior essa estimativa, maior sua contribuição para a heterose de seus híbridos. Porém, como pode ser visualizado anteriormente, não foi observada heterose relevante para nenhum dos cruzamentos do estudo, mas a partir desses valores é possível observar que o genitor Hawaï 7996 é o mais divergente em relação aos outros genótipos. Tal resultado é coerente com o fato de que, para esse caráter, o genitor Hawaï 7996 é bastante diferente dos demais genitores.

Tabela 16. Estimativas do efeito da capacidade específica de combinação (s_{ii}) de cada genitor com ele próprio, para resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia* spp. em tomateiro

Genitores	Sobrevivência (%)
Rotam	-1,05
Rodade	-0,89
Vietnamita	-11,52
Hawaï 7996	23,39
TPN191	-9,94
D.P.	13,97

No caso da CEC para resistência à murcha-bacteriana em questão, apenas o híbrido Rodade x TPN191 apresentou valores altos e positivos, porém nenhum de seus genitores apresenta alta CGC. Já os híbridos Rotam x

Rodade, Rotam x Hawaii 7996 e Hawaii 7996 x TPN191 apresentam valores altos e negativos, o que indica que essas combinações se comportaram pior do que se esperava.

Tabela 17. Estimativas do efeito da capacidade específica de combinação (s_{ij}) entre genitores, para resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia* spp. em tomateiro

Genitores	Sobrevivência (%)
Rotam X Rodade	-13,17
Rotam X Vietnamita	-3,65
Rotam X Hawaii 7996	-21,90
Rotam X TPN191	0,32
Rodade X Vietnamita	-3,81
Rodade X Hawaii 7996	5,72
Rodade X TPN191	11,26
Vietnamita X Hawaii 7996	-5,87
Vietnamita X TPN191	-0,32
Hawaii 7996 X TPN191	-18,57
D.P.	10,58

De maneira geral, este estudo demonstrou que nenhum dos híbridos derivados dos cruzamentos entre os genitores apresentou resistência superior ao genitor mais resistente, o genótipo Hawaii 7996, tanto em condições de inoculação e avaliação precoce para o biovar 2 de *R. solanacearum*, quando para a resistência em nível de campo para *Ralstonia* spp. Embora a identificação de híbridos com resistência superior que os genitores fosse desejada, o desenvolvimento de tais genótipos com maior resistência à murcha-bacteriana combinando as fontes de resistência usadas nesse estudo parece ser improvável. A grande variância da razão CGC para CEC indica a importância dos efeitos aditivos x aditivos na genética da resistência à murcha-bacteriana. Consequentemente, o cruzamento de genitores com alta CGC para o caráter, associados à metodologia de seleção recorrente, seria uma das melhores alternativas no melhoramento do tomateiro visando aumentar a resistência à murcha-bacteriana, por meio do aumento da concentração de alelos favoráveis para esse caráter.

Com relação aos estudos de resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum*, deve-se dar atenção especial a estudos que busquem identificar novas fontes de resistência para o início de um programa melhoramento para resistência à esse biovar, uma vez que apenas um genótipo (Hawaii 7996) apresentou nível aceitável de resistência à este patógeno, o qual é bastante agressivo. Além disso, genótipos que em outros estudos com outros filótipos/biovars demonstraram certo nível de resistência à murcha-bacteriana, foram suscetíveis no presente estudo, o que mostra a necessidade urgente de buscar por novas fontes de resistência que sejam efetivas para os filótipos/biovars presentes nos solos do Brasil. Por fim, considerando que a resistência à murcha-bacteriana é isolado específico (Wang *et al.* 2000) e também filótipo específica (Carmeille *et al.* 2006), estudos mais aprofundados envolvendo abordagens moleculares, mapeamento genético e estudos de associação genômica, são imprescindíveis para garantir que a identificação e seleção de novos genes de resistência, garantindo ganhos de seleção para resistência a esta doença bacteriana e amenizando problemas com a quebra precoce de resistência das fontes atualmente utilizadas.

3.4. Conclusões

Com base nos estudos de avaliação precoce para resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum* e na avaliação da resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia* spp. em nível campo, envolvendo o desempenho *per se*, heterose e capacidades de combinação entre as linhagens de tomateiro, pode-se concluir que:

- O biovar 2 de *R. solanacearum* mostrou-se muito efetivo no processo de colonização e indução de sintomas de murcha-bacteriana nos genótipos de tomateiro, levando a níveis muito elevados de mortalidade das plantas;

- Somente o acesso Hawaii 7996 mostrou nível satisfatório de resistência ao biovar 2 de *R. solanacearum* e nas condições deste estudo;

- O acesso Hawaii 7996 apresentou elevada capacidade geral de combinação tanto no experimento de resistência por infecção controlada, quanto no experimento de avaliação de resistência à murcha-bacteriana em nível de campo;

- A combinação híbrida Hawaii 7996 x Rodade foi a única que apresentou valores positivos e relevantes para capacidade específica de combinação, no experimento de resistência por infecção controlada e no experimento de avaliação de resistência à murcha-bacteriana em nível de campo;

- Considerando que o acesso Hawaii 7996 apresentou expressiva capacidade geral e específica de combinação, em relação aos demais acessos avaliados nos estudos em questão, recomenda-se o mesmo como sendo um dos principais genitores para programas de melhoramento visando aumentar a resistência à murcha-bacteriana em tomateiro.

Referências

- Acosta J, Jibert J and Quinon V (1964) Heritability of bacterial wilt in tomato. **Proc Am Soc Hort Sci** 84: 455–462.
- Acosta JC (1972) Genetic analysis for bacterial wilt resistance in a tomato cross, *Lycopersicon esculentum* Mill. ´ L. pimp-inellifolium Mill. p. 186–190. In **Proc. Third Annu Meeting Crop Sci Soc Philippines**.
- Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J and Besse P (2006) Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. **Theoretical and Applied Genetics** 113: 110–121.
- Cruz CD, Regazzi AJ and Carneiro CS (2012) **Modelos Biométricos – Aplicados ao Melhoramento Genético Volume 1**. UFV, Viçosa, 514p.
- Danesh D, Aarons S, McGill GE and Young ND (1994) Genetic Dissection of Oligogenic Resistance to Bacterial Wilt in Tomato. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI** 7: 464–471.
- Gonzalez WG and Summers WL (1995) A comparison of *Pseudomonas solanacearum*-resistant tomato cultivars as hybrid parents. **Journal of the American Society for Horticultural Science** Vol. 120 , 6 ; 891-895 (1995) 120: 891–895.

- Griffing B (1956) Concept of General and Specific Combining Ability in Relation to Diallel Crossing Systems. **Australian Journal of Biological Sciences** **9**: 463–493.
- Grimault V, Prior P and Anaïs G (1995) A Monogenic Dominant Resistance of Tomato to Bacterial Wilt in Hawaii 7996 is Associated with Plant Colonization by *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Phytopathology** **143**: 349–352.
- Hanson PM, Licardo O, Hanudin, Wang J-F and Chen J (1998) Diallel Analysis of Bacterial Wilt Resistance in Tomato Derived from Different Sources. **Plant Disease** **82**: 74–78.
- Henderson WR and Jenkins SF (1972) ‘Venus’ and ‘Saturn’ tomato varieties resistant to southern bacterial wilt. **HortScience** **7**: 346.
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology** **44**: 693–695.
- Khanna KR and Chaudhary RC (1974) THE NATURE OF GENE ACTION AND COMBINING ABILITY FOR SOME VEGETATIVE CHARACTERS IN TOMATO National branches was counted from the base up to a height of 30 cm . The diallel cross was. **Euphytica** **23**: 159–165.
- Mangin B, Thoquet P, Olivier J and Grimsley NH (1999) Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. **Genetics** **151**: 1165–1172.
- Mohamed MES, Umaharan P and Phelps RH (1997) Genetic nature of bacterial wilt resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) accession LA 1421. **Euphytica** **96**: 323–326.
- Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B and Allen C (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC genomics** **17**: 90.
- Prior P, Grimault V and Schimit J (1994) Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: Present status and prospects. CAB International, p. 209–223. In Hayward AC and Hartman GL (eds) **Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent *Pseudomonas solanacearum***.
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rouamba A, Laterrot H and Moretti A (1988) A case of relation between resistances to *Pseudomonas solanacearum* and *Verticillium* pathotype. p. 43–44. In **Rep Tomato Genet Coop** **38**.
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L and Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. s.* **International journal of systematic and evolutionary microbiology** **64**: 3087–103.
- Scott JW, Somodi GC, Jones B and East S (1988) Bacterial Spot Resistance Is Not Associated With Bacterial Wilt Resistance in Tomato. **Proc. Fla. State Hort. Soc.** 390–392.
- Scott JW, Wang JF and Hanson PM (2005) BREEDING TOMATOES FOR RESISTANCE TO BACTERIAL WILT, A GLOBAL VIEW. **Acta Horticulturae** 161–172.
- Sharma KC, Rathee VK and Verma S (2002) Identification of resistance sources for bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **The Indian Journal of Agricultural Sciences** **72**.
- Sprague GF and Tatum LA (1942) General vs. specific combining ability in single crosses of corn. **Journal of the American Society of Agronomy** **34**: 923–932.

- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H and Grimsley N (1996) Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI 9**: 826–836.
- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Prior P, Anais G, Mangin B, Bazin B, Nazer R and Grimsley N (1996) Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI 9**: 837–842.
- Venkowsky R and Barriga P (1992) **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 496p.
- Wang J-F, Hanson P and Barnes JA (1998) Worldwide Evaluation of an International Set of Resistance Sources to Bacterial Wilt in Tomato. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 269–275. In **Bacterial Wilt Disease**.
- Wang JF, Hanson PM and Barnes JA (1996) Preliminary results of worldwide evaluation of international set of resistance sources to bacterial wilt in tomatoes. **Bacterial Wilt Newsletter 13**: 8–10.
- Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L and Grimsley NH (2000) Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI 13**: 6–13.
- Winsted NN and Kelman A (1952) Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology 42**: 628–634.
- Yaseen M (2016) DiallelAnalysisR: Diallel Analysis with R.

4. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE PORTA ENXERTOS DE TOMATEIRO CULTIVADOS EM SOLO INFESTADO E NÃO INFESTADO POR *RALSTONIA* SPP.

Resumo

O uso de porta-enxertos em tomateiro visa promover maior sanidade e vigor ao genótipo usado como copa. Assim, é importante que o porta-enxerto seja resistente às principais doenças de solo e também que seja capaz de melhorar os caracteres produtivos e de qualidade da cultura. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de linhagens de tomateiro e de suas combinações híbridas, visando o aumento da resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia* spp., e incremento dos parâmetros produtivos de um híbrido comercial utilizado como copa, por meio da metodologia de análise dialélica e estudos dos efeitos de heterose e capacidade de combinação. Cinco linhagens e seus 10 respectivos híbridos foram usados como porta-enxertos para a cultivar comercial de tomateiro Gabrielly, da Hazera Seeds. As plantas enxertadas foram transplantadas em duas áreas, sendo uma não infestada com *Ralstonia* spp. (Área N) e a outra infestada com *Ralstonia* spp. (Área R), em canteiros espaçados de 1,80 m entre si, com 0,40 m entre plantas, cobertos com *mulching* plástico. No experimento de campo foi avaliada a produção total por parcela (PTP), o número de frutos por planta (NFP) e a massa fresca dos frutos (MFF). De forma complementar, foram coletadas amostras do solo destas duas áreas, os quais foram colocadas em vasos, para cultivo dos genótipos e avaliação de caracteres massa seca de raízes (MSR), comprimento médio das raízes (CMR), área superficial das raízes (ASR), diâmetro médio das raízes (DMR), volume radicular (VR) e massa seca da parte aérea (MSPA). Com base nestes experimentos foi possível constatar que o maior nível de resistência à murcha-bacteriana de Hawaii 7996 e de suas combinações híbridas, não está associado ao maior desempenho produtivo sob ausência ou baixa infestação de *Ralstonia* spp. no solo. O genótipo Rodade foi aquele que apresentou maior potencial nas combinações híbridas, para aumentar a produtividade das plantas e massa fresca dos frutos. Existem associações positivas e significativas entre o maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas usadas como porta-enxertos e a maior produtividade de frutos de tomateiro, sendo que o cruzamento entre os genitores Hawaii 7996 x Rodade é o mais promissor para o desenvolvimento de genótipos que combinem elevada resistência à *Ralstonia* spp. e melhor desempenho na produção de frutos de tomateiro.

Palavras-chave: Análise dialélica; *Ralstonia* spp.; Resistência em nível de campo; Sistema radicular; *Solanum lycopersicum*

Abstract

The use of tomato rootstocks aims to promote greater sanity and vigor to the genotype used as a scion. Thus, it is important that the rootstock is resistant to the main soil diseases and also that it is capable of improving the productivity and quality characteristics of the crop. For this reason, the objective of this work was to evaluate the performance of tomato lines and their hybrid combinations, aiming to increase resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia* spp., and increase the yield parameters of a commercial hybrid used as a scion, through the methodology of diallel analysis and studies of the effects of heterosis and combining ability. Five lines and their respective 10 hybrids were used as rootstocks for the commercial tomato variety Gabrielly, from Hazera Seeds. The grafted plants were transplanted into two areas, one of which was not infested with *Ralstonia* spp. (Area N) and the other one infected with *Ralstonia* spp. (Area R), in beds spaced 1,80 m apart, with 0,40 m between plants, covered with plastic mulching. In the field experiment the total production per plot (PTP), number of fruits per plant (NFP) and fresh fruit mass (MFF) were evaluated. In addition, soil samples of these two areas were collected, and placed in pots for genotype evaluation of root dry mass (MSR), mean root length (CMR), root surface area (ASR), root mean diameter (DMR), root volume

(VR) and dry shoot mass (MSPA). Based on these experiments, it was possible to verify that the highest level of bacterial wilt resistance of Hawaii 7996 and its hybrid's combinations is not associated to higher productive performance under absence or low infestation of *Ralstonia* spp. Rodade genotype was the one with the greatest potential in the hybrid combinations to increase plant yield and fresh fruit mass. There are positive and significant associations between the greater development of the root system of the plants used as rootstocks and the greater yield of tomato fruits, and the cross between the Hawaii 7996 x Rodade parents is the most promising for the development of genotypes that combine high resistance to *Ralstonia* spp. and better performance in tomato fruit production.

Keywords: Diallel analysis; *Ralstonia* spp.; Field-level resistance; Root system; *Solanum lycopersicum*

4.1. Introdução

O melhoramento para resistência à murcha-bacteriana tem sido muito difícil devido à grande variação genética do patógeno, influência de efeitos ambientais na seleção de genótipos resistentes, problemas de ligação de QTLs de resistência a *loci* que conferem tamanho pequeno aos frutos, entre outros fatores. Genótipos que são selecionados e que parecem ser resistentes em uma localidade podem ser suscetíveis em outras (Prior *et al.* 1994, Hanson *et al.* 1996, Wang *et al.* 1998), tornando ainda mais difícil a obtenção de genótipos com boas características hortícolas e com alto nível de resistência à murcha-bacteriana (Scott *et al.* 2005).

Uma estratégia para lidar com tais dificuldades poderia ser a piramidação de genes de resistência, cruzando acessos que são fontes de resistência, como por exemplo, acessos oriundos de *S. pimpinellifolium*, como Hawaii 7996 e de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* como o acesso L285. O cruzamento Hawaii 7996 x L285 poderia servir para facilitar a seleção e piramidação de QTLs de resistência, porém haveria prejuízo no ganho de seleção para tamanho do fruto e o rendimento da produção, importantes em nível comercial, sendo características essenciais para a tomaticultura realizada em campo aberto. A abordagem utilizando piramidação de genes de resistência, para obter sucesso requer a caracterização genética dos acessos que são fontes de resistência, além de novas fontes, utilizando marcadores moleculares e ensaios de avaliação em campo. Contudo, selecionar fontes apropriadas para obter ganhos com a seleção para outras características, também parece ser problemático (Razdan and Mattoo 2007).

Uma estratégia para desenvolver cultivares com maior tamanho de frutos e rendimento de produção adequados, seria concentrar QTLs do acesso Hawaii 7996 por cruzamentos e introgressões com um genitor de boa performance agrônômica, quebrando ligações indesejáveis. Porém, a ligação de tais QTLs com um grande número de outras características que reduzem o desempenho das plantas pode retardar o progresso de seleção. No fim, fica evidente que é necessário desenvolver populações e realizar inúmeros testes a fim de confirmar os níveis de resistência aos múltiplos isolados de *Ralstonia* spp., em inúmeros ambientes (Razdan and Mattoo 2007).

De forma geral, o melhoramento para resistência à murcha-bacteriana deve levar em consideração a região de cultivo das plantas e as condições climáticas do ambiente em questão (Hayward 1991). Segundo (Huet 2014), o sucesso limitado de cultivares resistentes é devido, principalmente, aos contratempos que o processo de desenvolvimento de cultivares resistentes devem ultrapassar. Primeiramente, o programa deve combinar resistência durável com características agrônômicas desejáveis. Em segundo lugar, as cultivares resistentes devem ser capazes de enfrentar a diversidade de zonas agro-ecológicas contrastantes, onde as bactérias *Ralstonia* spp. se proliferam e persistem no solo com alta variabilidade genética de isolados. Terceiro, a seleção de cultivares altamente resistentes devem ser priorizadas para evitar a disseminação bacteriana devido à presença de plantas tolerantes que hospedam

bactérias virulentas sem demonstrar sintomas da doença. Por último, as fontes de resistência disponíveis tem demonstrado um padrão poligênico de resistência e, apesar da identificação de QTLs de efeito maior controlando a resistência ao patógeno em tomateiro (Mangin *et al.* 1999, Carmeille *et al.* 2006, Wang *et al.* 2013), tabaco (Qian *et al.* 2013) e berinjela (Lebeau *et al.* 2013), o desenvolvimento de cultivares resistentes é agravado pela dificuldade de transferir para as cultivares um grande número de genes que podem estar ligados a características não desejadas (Denny 2007).

Deste modo, a alternativa mais rápida e provavelmente o caminho mais fácil, seria o melhoramento do tomateiro para aumentar a resistência à *Ralstonia* spp., desenvolvendo genótipos para serem utilizados como porta-enxerto. Esse objetivo tem sido comum e vem acontecendo nas empresas privadas. Apesar da enxertia ser utilizada na agricultura a mais de 2000 anos, seu uso comercial tornou-se comum apenas no século XX (Lee and Oda, 2010). Porém, apenas nos últimos 20 anos é que os pesquisadores perceberam o real potencial dessa antiga técnica e começaram a estudar os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na interação entre genótipos utilizado como porta-enxertos e genótipos utilizados como copa (Albacete; 2015), proporcionando maior conhecimento sobre essa antiga técnica, além do aprimoramento e avanço significativo em sua utilização na agricultura. A técnica da enxertia pode contribuir muito para a segurança alimentar da população com o seu eminente crescimento, ajudando a aumentar o rendimento de cultivares elite; contribuindo para superar o problema de limitação de crescimento de certas cultivares em condições sub-ótimas, como por exemplo, no manejo de problemas bióticos com patógenos de solo (fungos, bactérias e nematoides); bem como ajudando a amenizar problemas com fatores abióticos, tais como temperaturas extremas, acidez ou alcalinidade do solo ou contaminantes do mesmo. Como consequências mais diretas do uso da enxertia, há a possibilidade de diminuir o uso de produtos químicos como fertilizantes e agroquímicos, ou até mesmo aumentar a eficiência do uso de recursos naturais, tais como água e nutrientes, gerando novas combinações genéticas via epigenética e criando novos produtos com qualidade superior.

Outro fato importante sobre os porta-enxertos é em relação ao fenótipo gerado na combinação copa/porta-enxerto. Normalmente, nas culturas agrícolas, a variabilidade fenotípica reflete as interações entre genótipo e ambiente (G x E). Porém, em plantas enxertadas, o fenótipo é mais complexo, pois o genótipo é a combinação de dois diferentes genótipos, causando assim a interação porta-enxerto x copa x ambiente (PxCxExE), que são ocasionadas pela união entre porta-enxerto e copa, ou seja, dois diferentes genótipos, em uma mesma planta. Adicionalmente, o próprio efeito da união entre o porta-enxerto com a copa tem um papel importante na interação (PxC). Essas interações determinam os efeitos positivos ou negativos dos porta-enxertos na performance e qualidade dos frutos do genótipo usado como copa.

Inúmeros trabalhos sobre a influência dos porta-enxertos na produção e qualidade dos frutos foram realizados. (Nilsen *et al.* 2014) demonstram que alguns porta-enxertos de tomate mais tolerantes ao estresse hídrico moderado, podem aumentar consideravelmente a produção de outros genótipos usados como copa que possuem pouca tolerância ao estresse hídrico. (Fernández-Garcí *et al.* 2004) verificaram que o uso de porta-enxertos pode melhorar a qualidade dos frutos de tomateiro em ambientes cujos solos apresentem salinidade. (Kunwar *et al.* 2015) demonstraram a efetividade do uso de um único porta-enxerto no aumento da produtividade de tomates industriais para manejo de múltiplas doenças, incluindo *Ralstonia* spp. e nematoides. Porém, um dos poucos trabalhos encontrados para hortaliças contendo uma abordagem genética em estudos com porta-enxertos foi o de (Kormos and Kormos 1955), onde os autores relataram a presença de um único gene dominante responsável pela incompatibilidade de enxertia em pimentão.

De maneira geral, os estudos envolvendo porta-enxertos em hortaliças possuem uma abordagem mais fitotécnica, não tendo sido encontradas pesquisas sobre as relações genéticas e combinações híbridas entre diferentes linhagens de tomateiro, visando incremento de resistência a doenças de solo e melhoria do potencial agrônômico de genótipos utilizados como copa. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de linhagens de tomateiro e de suas combinações híbridas, visando o aumento da resistência à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia* spp., e incremento dos parâmetros produtivos de um híbrido comercial utilizado como copa, por meio da metodologia de análise dialélica e estudos dos efeitos de heterose e capacidade de combinação.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material vegetal e hibridações

Para obtenção dos híbridos foram utilizadas cinco linhagens de tomate, sendo três conhecidas pela resistência à murcha-bacteriana (Hawaii 7996, Rotam, Rodade), uma linhagem com relatos de resistência no leste asiático (Vietnamita) e uma suscetível (TPN-191 oriunda do banco de germoplasma de hortaliças do Departamento de Genética da ESALQ/USP). A descrição geral das características das linhagens utilizadas neste trabalho estão detalhadas no ANEXO I. Os cruzamentos foram realizados em casa de vegetação no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba, São Paulo, no período de fevereiro a junho de 2016. Os cruzamentos foram realizados em esquema de dialélico completo, obtendo-se todas as 10 combinações híbridas possíveis utilizando as cinco linhagens de tomateiro. Para realizar os cruzamentos, os botões florais das plantas receptoras de pólen foram emasculados dois dias antes do cruzamento, visando atingir o ponto adequado de maturação nos órgãos reprodutivos femininos e, conseqüentemente, maior probabilidade de fertilização e obtenção de sementes. As flores selecionadas para polinização apresentavam as pétalas esbranquiçadas ou esverdeadas, momento no qual o pólen está fortemente aderido às fendas verticais nas anteras, reduzindo riscos de possíveis autopolinizações. Após a completa maturação dos frutos (aproximadamente 60 dias após a polinização), eles foram colhidos e suas sementes extraídas. Estas sementes foram então enviadas para produzir as mudas enxertadas, no viveiro comercial de mudas da Hidrocerees Comercial Agrícola LTDA (Santa Cruz do Rio Pardo – SP). Foi utilizado como copa o híbrido Gabryelle gentilmente fornecido pela empresa Hazera Seeds do Brasil. O híbrido Gabryelle apresenta crescimento determinado, fruto tipo saladete alongado, firme, com alta uniformidade, resistente ao TYLCV (Geminivírus) e TSWV (Vira-cabeça).

4.2.2. Experimentos em área infestada e não infestada com *Ralstonia* spp.

A avaliação dos genitores e dos híbridos foi realizada em duas áreas do campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, São Paulo, com dimensões de aproximadamente 1000 m² cada. Uma das áreas possuía elevado nível de infestação por *Ralstonia* spp. (Área R) e a outra área até então não havia apresentado problemas de morte de plantas de tomateiro por murcha-bacteriana (Área N), o que não garante a ausência do patógeno no solo. Os genótipos foram avaliados em seu potencial para uso como porta-enxertos, visando aumentar a resistência à murcha-bacteriana e promover maior vigor para a cultivar híbrida usada como copa.

Para a realização dos experimentos nos dois locais foram feitos canteiros, com o uso de um encanteirador, espaçados de 1,80 m entre si (entre linhas), os quais foram cobertos com *mulching* plástico preto (filme plástico). Os experimentos foram instalados em blocos ao acaso com 15 tratamentos e três repetições, totalizando 45 parcelas experimentais. Cada parcela foi constituída por seis plantas úteis, espaçadas em 0,40 m entre plantas na parcela.

O manejo do experimento foi semelhante a uma cultura comercial para produção de tomate. A condução do experimento foi sob o manejo de meia estaca, cada planta foi conduzida individualmente e os brotos foram retirados até o aparecimento do primeiro cacho floral. A adubação de base foi realizada de acordo com o recomendado após a análise do solo e a irrigação e a fertirrigação foi via gotejamento. O controle de doenças e pragas foi realizado conforme as necessidades da cultura.

Neste experimento, foram avaliadas a produção total de frutos por parcela (PTP: representa a massa total de frutos por parcela, expressa em kg.parcela⁻¹), o número de frutos por parcela (NFP: frutos de cada parcela foram contados em cada colheita) e massa fresca de frutos (MFF: foi realizada a relação PTP/NFP dos frutos colhidos da parcela e os resultados expressos em g.fruto⁻¹).

4.2.3. Avaliação de parâmetros de desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular em ambiente protegido

Uma vez que os caracteres de raiz são importantes para genótipos de tomateiro usados como porta-enxertos, foi realizado um experimento para avaliar as diferenças nos caracteres de raízes dos genótipos usados neste trabalho. Para isso, foi coletada solo (camada superficial de 0-20 cm) das mesmas áreas usadas nos experimentos de campo (área infestada e não infestada com *Ralstonia* spp.), o qual foi colocado em vasos de 12 L em estufa do Departamento de Genética, ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Os tratos culturais, irrigação, adubação e controle de insetos-praga e doenças foram realizados de acordo com o recomendado para a cultura. O experimento para avaliar os caracteres do sistema radicular foi instalado em blocos casualizados com seis repetições, com uma única planta por parcela. Cada um dos dois tipos de solos foi considerado como um ambiente diferente. Todos os genótipos receberam o híbrido Gabryelle como copa, por meio de enxertia, tal como descrito anteriormente.

As mudas enxertadas dos genitores e dos híbridos F₁ foram transplantadas para os vasos que continham o solo dos campos, sendo conduzidas até que aproximadamente 50% das plantas chegassem à antese (perto de 45 – 60 dias após o transplante). Após esse período, as plantas foram retiradas dos vasos e os sistemas radiculares intactos foram lavados com água para remover as partículas de solo. Os sistemas radiculares foram armazenados em recipientes plásticos em uma solução de etanol 25% para sua conservação. As partes aéreas foram desidratadas em estufa com circulação de ar forçada, à temperatura de 65 °C por 72 horas e em seguida pesadas em balança de precisão analítica para obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA: expressa em g.planta⁻¹). Para as análises radiculares foram analisados os caracteres de comprimento total de raízes (CTR: expresso em cm.planta⁻¹), diâmetro médio de raízes (DMR: expresso em cm.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, expressa em cm².planta⁻¹), volume radicular (VR, expresso em cm³.planta⁻¹) e massa seca das raízes (MSR, expressa em g.planta⁻¹).

As estimativas de CTR, DMR, ASR e VR foram obtidas pela análise de imagens, utilizando o software WinRHIZO Arabdopsis (Reagent Instruments Inc., Quebec, Canadá) acoplado a um scanner profissional Epson Expression 11000XL, com definição 400 dpi segundo o protocolo modificado de (Trachsel *et al.* 2009). Para obter a

massa seca das raízes, após as análises de imagens, as raízes foram desidratadas em estufa com circulação de ar forçada, à temperatura de 65 °C por 72 horas e em seguida pesadas em balança de precisão analítica.

4.2.4. Análises genético-estatísticas dos experimentos de campo

Cada uma das duas áreas de campo nas quais os experimentos foram instalados (Área N e Área R), foi considerada como sendo um ambiente diferente. Contudo, em análises preliminares, o teste de (Pearson and Hartley 1956) indicou que magnitude das variâncias ambientais era elevada, não atendendo os pressupostos para realização da análise conjunta. Sendo assim, os dados dos experimentos de campo (NFP, PTP e MFF) foram análises para cada área separadamente, de acordo a análise de variância univariada, seguindo modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + b_j + g_i + e_{ij}$$

Em que:

y_{ij} : valor da observação do genótipo i , no bloco j ;

μ : é a constante comum a todos os genótipos;

g_i : efeito do genótipo i , sendo $i = 1, \dots, i_i$;

b_j : efeito do bloco j , sendo $j = 1, \dots, j_j$;

e_{ij} : efeito do resíduo experimental do genótipo i , no bloco j .

A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

4.2.4.1. Análise da capacidade de combinação nos experimentos de campo

As análises dialélicas foram realizadas pelo método 2, modelo 1 (fixo) proposto por (Griffing 1956), envolvendo genitores e híbridos, a partir dos quais foram estimadas a Capacidade Geral de Combinação (CGC) das linhagens genitoras e as Capacidades Específicas de Combinação (CEC) dos pares de cruzamentos. Para estimar a capacidade geral e específica de combinação, as análises de variância foram realizadas conforme o modelo estatístico a seguir:

$$y_{ij} = \mu + g_i + g_j + s_{ij} + e_{ij}$$

Onde:

y_{ij} : valor médio da combinação híbrida ($i \neq j$) ou do progenitor ($i=j$);

μ : é uma constante inerente a todas as observações (média geral);

g_i e g_j : efeitos da capacidade geral de combinação do i -ésimo e do j -ésimo progenitor, respectivamente;

s_{ij} : efeito da capacidade específica de combinação para os cruzamentos entre os progenitores de ordem i e j , considerado que $s_{ij} = s_{ji}$;

e_{ij} : erro experimental médio.

4.2.4.2. Estimativa das heteroses nos experimentos de campo

Os valores da heterose dos 10 híbridos foram obtidos a partir de sua relação com a média dos genitores, de acordo com a metodologia tradicional descrita em (Venkovsky and Barriga 1992). A heterose dos híbridos, em porcentual, foi calculada em relação à média dos genitores (H_{mg}) e em relação ao genitor superior (H_{gs}):

$$H_{mg}(\%) = 100 \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}}{\bar{P}}$$

$$H_{gs}(\%) = 100 \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}_s}{\bar{P}_s}$$

Sendo que, $\bar{F}_1$ é a média de resistência dos híbridos, $\bar{P}$ é a média de resistência dos genitores e $\bar{P}_s$ é a média de resistência do genitor superior.

4.2.5. Análises genético-estatísticas do experimento em ambiente protegido

Os diferentes solos colocados nos vasos em estufa foram considerados como ambientes diferentes. O teste de (Pearson and Hartley 1956) indicou que magnitude das variâncias ambientais, atendia aos pressupostos para realização da análise conjunta. Sendo assim, os dados dos experimentos em estufa (MSPA, MSR, CTR, DMR, ASR e VR) foram analisados por meio da análise conjunta, seguindo modelo estatístico:

$$y_{ijk} = \mu + b_{j(k)} + g_i + a_k + (ga)_{ik} + \varepsilon_{ij(k)}$$

Onde:

y_{ijk} : é o valor observado no i -ésimo genótipo, no j -ésimo solo, do k -ésimo bloco;

μ : é a constante comum a todas as observações;

$b_{j(k)}$: é o efeito do j -ésimo bloco no k -ésimo ambiente (solo);

g_i : é o efeito do i -ésimo genótipo;

a_k : é o efeito do k -ésimo ambiente (solo);

$(ga)_{ik}$: é o efeito da interação do i -ésimo genótipo, com o k -ésimo ambiente (solo);

$\varepsilon_{ij(k)}$: é o efeito do resíduo experimental do i -ésimo genótipo, j -ésimo bloco no k -ésimo ambiente

4.2.5.1. Análise da capacidade de combinação do experimento em ambiente protegido

As análises dialélicas foram realizadas pelo método 2, modelo 1 (fixo) proposto por (Griffing 1956), envolvendo genitores e híbridos, a partir dos quais foram estimadas a Capacidade Geral de Combinação (CGC) das linhagens genitoras e as Capacidades Específicas de Combinação (CEC) dos pares de cruzamentos. Para estimar a capacidade geral e específica de combinação, as análises de variância foram realizadas conforme o modelo estatístico a seguir:

$$y_{ij} = \mu + g_i + g_j + s_{ij} + a_k + ga_{ik} + ga_{jk} + sa_{ijk} + \varepsilon_{(k)ij}$$

Onde:

y_{ij} : valor médio da combinação híbrida ($i \neq j$) ou do progenitor ($i=j$);

μ : é uma constante inerente a todas as observações (média geral);

g_i e g_j : efeitos da capacidade geral de combinação do i -ésimo e do j -ésimo progenitor, respectivamente;

s_{ij} : efeito da capacidade específica de combinação para os cruzamentos entre os progenitores de ordem i e j , considerado que $s_{ij} = s_{ji}$;

a_k : é o efeito do ambiente k ;

ga_{ik} e ga_{jk} : é o efeito da interação entre capacidade geral de combinação (CGC) associados ao i e j -ésimo genitor com os ambientes k , respectivamente;

sa_{ijk} : é o efeito da interação entre a capacidade específica de combinação (CEC) associado aos genitores i e j e com os ambientes k ;

$\varepsilon_{(k)ij}$: é o erro experimental médio.

4.2.5.2. Estimativa das heteroses no experimento em ambiente protegido

Os valores da heterose dos 10 híbridos foram obtidos a partir de sua relação com a média dos genitores, de acordo com a metodologia tradicional descrita em (Venkovsky and Barriga 1992). A heterose dos híbridos, em porcentual, foi calculada em relação à média dos genitores (H_m) e em relação ao genitor superior (H_g):

$$H_{mg}(\%) = 100 \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}}{\bar{P}}$$

$$H_{gs}(\%) = 100 \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}_s}{\bar{P}_s}$$

Sendo que, $\bar{F}_1$ é a média de resistência dos híbridos, $\bar{P}$ é a média de resistência dos genitores e $\bar{P}_s$ é a média de resistência do genitor superior.

4.2.6. Coeficientes de Correlação

Foram estimadas as correlações de Pearson a partir das médias da análise conjunta, pois pode se obter informações importantes a partir da magnitude e do sinal de tais análises. A significância das correlações foi verificada pelo teste t de Student a 5% de probabilidade de erro. Também foram estimadas as correlações de Spearman a 5 % de probabilidade de erro, entre as médias obtidas para os caracteres de produção do experimento de campo, e do experimento em solo realizado em ambiente protegido.

Os dados experimentais foram organizados e submetidos às análises estatístico-genéticas nos softwares Microsoft Excel® e, utilizando-se o programa computacional R, versão 3.2.3 (R Core Team 2017) com o auxílio dos pacotes MICE (Buuren and Groothuis-Oudshoorn 2011), ggplot2 (Wickham 2009), DiallelAnalysisR (Yaseen 2016), Agricolae (Mendiburu 2017), car (Fox and Weisberg 2011), laercio (Silva 2010), e o programa Genes (Cruz 1998).

4.3. Resultados e discussão

Para ser usado como porta-enxerto, um genótipo de tomateiro deve proporcionar boa resistência a doenças de solo, promovendo também maior vigor e aumento do desempenho ao genótipo utilizado como copa sobre o mesmo. Basicamente, na combinação entre copa/porta-enxerto, o genótipo usado como porta-enxerto contribui para a expressão do fenótipo por meio dos atributos do sistema radicular, que envolve seu potencial para aumentar a resistência a doenças de solo, mas também sua capacidade de absorver e transportar água e nutrientes para a copa das plantas. Assim, neste trabalho, foram realizadas duas abordagens complementares, sendo uma delas direta e a outra indireta para avaliar os genótipos usados como porta-enxertos.

Na abordagem indireta, o desempenho dos genitores e híbridos utilizados como porta-enxertos foi avaliado por meio de sua capacidade de alterar os parâmetros de produtividade do genótipo usado como copa. Já na abordagem direta, foram mensuradas as diferenças entre os sistemas radiculares dos genótipos, para ajudar a explicar as diferenças observadas no desempenho dos parâmetros produtivos da copa.

Inicialmente, foram consideradas ambas as áreas (Área N e Área R), cultivadas ao mesmo tempo com os tomateiros. Contudo, como demonstrado no capítulo anterior, a taxa de mortalidade das plantas na área infestada com *Ralstonia* spp. foi muito elevada, levando à perda de parcelas inteiras. Mesmo assim, foi importante mensurar os parâmetros de produtividade da mesma, para estimar o real impacto da doença e também a importância do uso de genótipos resistentes como porta-enxerto.

Os valores e as significâncias para os quadrados médios e os coeficientes de variação para os caracteres avaliados encontram-se na (tabela 18) abaixo. A precisão experimental, avaliada pelo coeficiente de variação (CV), foi relativamente mais baixa na área infestada com *Ralstonia* spp., com CVs variando de 25,76% até 59,60%, ao passo na área não infestada, os CVs, foram menores, variando de 7,67% até 26,08%. Os valores de CV em torno de 20-30% são aceitáveis para experimentos de campo, estando dentro do esperado para a área não infestada com *Ralstonia* spp. Porém, no caso da área de ocorrência de murcha-bacteriana, os CVs elevados são uma consequência da própria taxa de mortalidades das plantas no campo, tendo sua precisão experimental comprometida.

Tabela 18. Resumo da análise de variância para os caracteres número de frutos por planta (NFP, frutos.planta⁻¹), produção total por parcela (PTP, kg.parcela⁻¹) e massa fresca dos frutos (MFF, g.fruto⁻¹), oriundas de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em área não infestada (Área N) e infestada (Área R) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

F.V.	G.L.	NFP		PTP		MFF	
		Área N	Área R	Área N	Área R	Área N	Área R
Blocos	2	3053,49	1453,40*	20,79	2,93	0,0000007 ^{ns}	0,000274 ^{ns}
Genótipos	14	1060,69	6881,90**	20,20*	35,41**	0,0004774**	0,000773**
Genitores (G)	4	982,11 ^{ns}	18141,50**	26,83*	96,14**	0,0007431**	0,001249**
Híbridos (H)	9	715,70 ^{ns}	2292,80**	16,12	10,32**	0,00041124**	0,000591**
G x H	1	4480,30*	3144,70**	30,44	18,25**	0,0000090 ^{ns}	0,000386
Resíduo	28	945,10	316,30	7,76	1,14	0,0000406	0,000101
C.V. (%)		23,89	59,60	26,08	55,60	7,67	25,76

; *, **, ns: significativo a 10%, 5%, 1% e não significativo, respectivamente, pelo teste F

As médias relativas aos genitores e híbridos utilizados como porta-enxertos, cultivados em ambas as áreas, são apresentadas na (tabela 19) abaixo. Para o caráter NFP na Área N, embora os valores absolutos sejam muito diferentes, com mínimo de 94 e máximo de 157 frutos/parcela, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos. Contudo, houve diferenças significativas para PTP, cuja maior produção foi observada para o cruzamento Rodade x TPN191, sendo o menor valor atribuído ao genitor TPN191, na Área N. Provavelmente, o genitor Rodade teve uma contribuição significativa na composição da média proporcionada pelo cruzamento Rodade x TPN191, uma vez que, dentre os genitores, Rodade foi também aquele que apresentou a maior média. Para a MMF também foram verificadas diferenças significativas, sendo os maiores frutos oriundos do genitor Rotam e do cruzamento Rotam x Rodade. Por outro lado, os genitores Hawaï 7996 e TPN191, quando usados como porta-enxerto, foram aqueles que proporcionaram frutos de menor tamanho (menor MFF) no genótipos usado como copa, nesta mesma Área N. Já no cultivo das plantas enxertadas sobre os genitores e híbridos, na área infestada com *Ralstonia* spp., os resultados foram completamente diferentes. Devido à elevada resistência à murcha-bacteriana proporcionada pelo Hawaï 7996, os valores de NFP, PTP e MFF foram os mais elevados nas parcelas com plantas enxertadas sobre o mesmo. De forma análoga ao observado nos capítulos anteriores, o cruzamento Hawaï 7996 x Rodade, que mostrou o maior nível de resistência à murcha-bacteriana, foi aquele que também proporcionou os melhores resultados para os parâmetros avaliados na área com alta infestação do patógeno.

Tabela 19. Médias dos genitores e híbridos para os caracteres número de frutos por planta (NFP, frutos.planta⁻¹), produção total por parcela (PTP, kg.parcela⁻¹) e massa fresca dos frutos (MFF, g.fruto⁻¹), oriundas de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em área não infestada (Área N) e infestada (Área R) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	NFP (frutos.planta ⁻¹)		PTP (kg.parcela ⁻¹)		MFF (g.fruto ⁻¹)	
	Área N	Área R	Área N	Área R	Área N	Área R
Rotam	114,66	10,66	10,45	0,23	102	23
Rodade	143,66	9	14	0,28	97	33
Vietnamita	111	5	8,17	0,11	73	21
Hawaii 7996	112,66	180,66	7,75	12,82	69	72
TPN191	94	3	6,71	0,03	70	11
Rotam x Rodade	131	3,66	14,32	0,19	109	35
Rotam x Vietnamita	143,66	1	12,96	0,03	90	27
Rotam x Hawaii 7996	145,66	37,66	11,54	1,65	80	44
Rotam x TPN191	121,33	6,33	9,13	0,18	76	28
Rodade x Vietnamita	134,33	2,33	10,2	0,1	76	43
Rodade x Hawaii 7996	144,33	56,66	11,03	5,73	76	67
Rodade x TPN191	157,66	19,33	15,43	0,47	98	24
Vietnamita x Hawaii 7996	139,66	81	10,5	5,34	75	66
Vietnamita x TPN191	101,33	0	7,92	0	79	0
Hawaii 7996 x TPN191	134,66	31,33	10,13	1,69	75	55
Média geral	128,64	29,84	10,68	1,92	0,083	0,039
Média genitores	115,2	41,66	9,42	2,69	82,2	32
Média cruzamentos	135,36	23,93	11,32	1,54	83,4	38,9
DMS	91,05	52,67	8,25	2,12	18,87	29,85

Considerando a elevada variação e elevada mortalidade de plantas na área infestada com *Ralstonia* spp., os demais parâmetros utilizados para estimar o potencial dos genótipos para uso como porta-enxertos, foram analisados e discutidos somente no experimento realizado na área não infestada com a bactéria. Assim, em relação à heterose, foram realizadas as análises para os três caracteres de produção, sendo que, para NFP, PTP e MFF, foram verificados valores positivos, tanto de heterose como de heterobeltiose. É interessante notar que, embora a área do experimento não seja uma área típica de alta infestação com *Ralstonia* spp., fica evidente que os cruzamentos que apresentaram maiores valores de heterose e heterobeltiose foram aqueles que possuem os genitores Hawaii 7996, Rodade e Rotam em sua composição.

Uma das hipóteses para esse fato seria que, na verdade, a área considerada não infestada com *Ralstonia* spp., pode ter o patógeno em níveis mais reduzidos, sendo suprimidos pelo equilíbrio com a microbiota do solo. Contudo, mesmo não havendo sua manifestação aparente, o patógeno poderia levar a uma queda na produção dos genótipos, favorecendo aqueles que possuem algum nível de resistência no sistema radicular. Outra hipótese seria de que o sistema radicular dos genótipos que possuem Hawaii 7996, Rodade e Rotam em sua composição, poderiam ser mais desenvolvidos e eficientes na absorção de água e nutrientes. Ou então, ambas as hipóteses poderiam complementar-se algum grau. Mais adiante, os estudos do sistema radicular das plantas nos solos infestado e não infestado, deverá fornecer algumas informações que devem ajudar a discutir melhor esse aspecto.

Tabela 20. Percentual de heterose em relação à média dos genitores (H_{mg}) e ao genitor superior (H_{gs}), para os caracteres número de frutos por planta (NFP, frutos.planta⁻¹), produção total por parcela (PTP, kg.parcela⁻¹) e massa fresca dos frutos (MFF, g.fruto⁻¹), oriundas de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em área não infestada (Área N) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	NFP		PTP		MFF	
	H_{mg}	H_{gs}	H_{mg}	H_{gs}	H_{mg}	H_{gs}
Rotam x Rodade	1,42	-8,81	17,14	2,29	9,35	6,98
Rotam x Vietnamita	27,32	25,29	39,20	24,02	3,20	-11,31
Rotam x Hawaïi 7996	28,15	27,04	26,81	10,43	-6,25	-21,14
Rotam x TPN191	16,29	5,82	6,41	-12,63	-11,68	-25,27
Rodade x Vietnamita	-6,50	-6,50	-24,33	-27,14	-18,83	-21,79
Rodade x Hawaïi 7996	12,62	0,47	1,42	-21,21	-8,94	-21,99
Rodade x TPN191	18,99	9,74	33,42	10,21	12,52	0,21
Vietnamita x Hawaïi 7996	24,89	23,97	31,91	28,52	4,70	2,05
Vietnamita x TPN191	-1,14	-8,71	6,45	-3,06	9,55	7,52
Hawaïi 7996 x TPN191	30,32	19,53	40,11	30,71	7,72	6,96
D.P.	13,28	14,45	20,50	20,36	10,73	13,84

Parte dos efeitos de heterose observados podem ser explicados pelo potencial de complementação entre genitores, o qual é mensurado na análise dialélica para os caracteres em estudo. Os quadrados médios e os componentes quadráticos associados à capacidade geral e capacidade específica de combinação estão descritos na (tabela 22) abaixo. Dentre os três caracteres analisados, PTP e MFF apresentaram significância para a CGC na análise dialélica. Porém, somente a MFF, indicou efeito significativo para a CEC entre as linhagens. Isso reflete a maior importância da ação de genes aditivos na expressão dessas características. Em relação à MFF, foi observada significância tanto para CGC quanto para a CEC, mostrando que o controle genético para esse caráter seria influenciado por genes de efeitos tanto aditivos como não aditivos..

Tabela 21. Resumo da análise de variância das estimativas da Capacidade Geral de Combinação e Capacidade Específica de Combinação, para os caracteres número de frutos por planta (NFP, frutos.planta⁻¹), produção total por parcela (PTP, kg.parcela⁻¹) e massa fresca dos frutos (MFF, g.fruto⁻¹), oriundas de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em área não infestada (Área N) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

F.V.	G.L.	NFP	PTP	MFF
		(frutos.planta ⁻¹)	(kg.parcela ⁻¹)	(g.fruto ⁻¹)
CGC	4	463,08 ^{ns}	13,44**	0,000408**
CEC	10	309,76 ^{ns}	4,03 ^{ns}	0,000059**
Resíduo	28	315,04	2,52	0,000014

**, ns: significativo a 1% e não significativo, respectivamente, pelo teste F

Em relação às estimativas da CGC de cada genitor, pode-se afirmar que há comportamento diferencial entre eles em relação PTP e MFF. Deste modo, em relação à PTP, o genitor que apresenta maior valor positivo é o Rodade e, sendo assim, seria o genitor favorável para aumentar a produção de frutos, quando combinado com os demais, quando usado para o desenvolvimento de porta-enxertos em um programa de melhoramento. Em seguida, viria o genitor Rotam que, embora com uma estimativa positiva, encontra-se próximo de zero, para esse caráter, não apresentando efeito significativo em sua combinação com os demais genitores. Os outros três genitores apresentam estimativas negativas indicando que não apresentam genes favoráveis para o caráter PTP, nessa combinação dialélica. Em relação à MFF, Rotam e Rodade apresentaram valores positivos, sendo, portanto os genitores mais adequados como fonte de alelos para esse caráter no desenvolvimento de porta-enxertos.

Tabela 22. Estimativas do efeito da capacidade geral de combinação (CGC) dos genitores, para caracteres produção total por parcela (PTP, kg.parcela⁻¹) e massa fresca dos frutos (MFF, g.fruto⁻¹), oriundas de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em área não infestada (Área N) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	PTP	MFF
Rotam	0,997	0,0084
Rodade	2,313	0,0081
Vietnamita	-0,733	-0,0045
Hawái 7996	-0,493	-0,0079
TPN191	-0,819	-0,0034
D.P.	1,367	0,0076

Como o único caráter que apresentou efeito significativo da CEC foi a MFF, foram analisadas as estimativas dos híbridos para apenas este. As estimativas dos efeitos da CEC (s_{ii} e s_{ij}) encontram-se na (tabela 24) abaixo. Foram observados valores de s_{ij} positivos e negativos em relação aos genitores para MFF, havendo indicação de que Rotam e Rodade seriam os mais divergentes em relação aos demais, o que é condizente também com a maior CGC encontrada para esses genitores. Para MFF, nenhum cruzamento apresentou valores altos absolutos, porém, em relações aos valores relativos aos outros cruzamentos, Rodade x TPN191 foi aquele que apresentou a maior estimativa de CEC.

Tabela 23. Estimativas do efeito da capacidade específica de combinação (s_{ij}) de cada genitor com ele próprio, para massa fresca dos frutos (MFF, g.fruto⁻¹), oriundas de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em área não infestada (Área N) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	MFF
Rotam	0,0086
Rodade	0,0078
Vietnamita	-0,0046
Hawái 7996	-0,0076
TPN191	-0,0043
D.P.	0,0076

De maneira geral, cruzamentos utilizando o genitor Rodade devem proporcionar boas populações para seleção de genótipos a serem usados como porta-enxertos, uma vez que este acesso foi capaz promover características de melhor desempenho do híbrido comercial enxertado sobre ele.

Tabela 24. Estimativas do efeito da capacidade específica de combinação (s_{ij}) entre genitores, para massa fresca dos frutos (MFF, g.fruto⁻¹), oriundas de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em área não infestada (Área N) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	MFF
Rotam x Rodade	0,0093
Rotam x Vietnamita	0,0032
Rotam x Hawaïi 7996	-0,0039
Rotam x TPN191	-0,0114
Rodade x Vietnamita	-0,0101
Rodade x Hawaïi 7996	-0,0074
Rodade x TPN191	0,0110
Vietnamita x Hawaïi 7996	0,0038
Vietnamita x TPN191	0,0045
Hawaïi 7996 x TPN191	0,0041
D.P.	0,0080

Até este momento, ficou evidente que as diferenças genotípicas entre os genitores e seus respectivos híbridos foram capazes de promover diferenças significativas no desempenho produtivo do híbrido comercial utilizado como copa. Contudo, tais diferenças podem ser devidas a um conjunto de fatores genéticos e morfológicos, devidos principalmente ao desenvolvimento diferenciado do sistema radicular de tais genótipos. Por esse motivo, com o objetivo de ajudar a explicar as diferenças observadas, foi instalado um experimento em ambiente protegido, a partir do qual foi possível avaliar as diferenças de parâmetros morfológicos das raízes dos genitores e híbridos.

Para os experimentos em casa de vegetação, conforme mencionado, foram coletados os solos das duas áreas utilizadas nos experimentos de campo: a área infestada (Área R) e a área não infestada (Área N) por *Ralstonia* spp. Porém, nos experimentos em casa de vegetação não foram verificados sintomas de murcha-bacteriana nas plantas cultivadas no solo contaminado. Tal fato deve ter sido causado devido ao clima no qual o experimento foi conduzido, sendo realizado em maio de 2017, cujas temperaturas começaram a ficar mais amenas. Como mencionado anteriormente, a temperatura é uma fator de extrema importância no desenvolvimento da doença. Além disso, outro fator que pode ter ocasionado tal fato, é a amostragem do solo que pode ter sido realizada em porções da área R que não apresentavam elevadas quantidades da bactéria causadora de murcha nas plantas. Deste modo, devido à ausência de plantas sintomáticas, o experimento foi analisado como se fossem dois solos diferentes, sendo assim dois ambientes de estudo.

Os valores e as significâncias para os quadrados médios e o coeficiente de variação para os caracteres avaliados se encontram respectivamente nas (tabelas 26, 27 e 28) abaixo. A precisão experimental foi baixa, com um alto valor de CV para todos os caracteres, exceto diâmetro médio de raiz. Tais resultados foram verificados nos dois

tipos de solo, nas análises individuais e também na análise conjunta dos experimentos. Esses fatores podem ter ocorrido devido à parcela experimental se tratar de apenas uma planta individual. Outro fato que deve ter atuado de maneira crucial para os altos CVs é relativo à possível perda de material radicular durante a lavagem das raízes devido à fragilidade do sistema radicular do tomateiro, a qual pode ter ocasionado as diferenças entre as repetições, uma vez que as raízes encontravam-se extremamente aderidas ao solo, tornando tal etapa a mais difícil do processo, e provavelmente a mais passível de sofrer com as variações.

Felizmente, foi possível a verificação de diferenças genéticas e estatísticas nos experimentos. No solo infestado (Área R) foram observadas diferenças significativas para todos os caracteres de raiz avaliados por imagens: comprimento das raízes (CTR), área superficial das raízes (ASR), diâmetro médio (DMR) e volume das raízes (VR). Contudo, nas análises de variância individuais, não foram verificadas diferenças para os caracteres de parte aérea avaliados, sendo estes a massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca das raízes (MSR). Já para o solo não infestado (Área N), somente o DMR apresentou diferença significativa entre os genótipos.

Tabela 25. Resumo da análise de variância individual para os caracteres massa seca da parte área (MSPA, g.planta⁻¹), massa seca de raízes (MSR, g.planta⁻¹), comprimento total das raízes (CTR, cm.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área infestada (Área R) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

F.V.	G.L.	MSPA	MSR	CTR	ASR	DMR	VR
Blocos	5	66,32 ^{ns}	0,165 ^{ns}	5758501,0 ^{ns}	56538,0 ^{ns}	0,013 ^{ns}	21,23 ^{ns}
Genótipos	14	65,51 ^{ns}	0,334 ^{ns}	5132968,0**	171686,0**	0,003**	38,03**
Resíduo	28	52,33	0,304	6126877,0	146005,0	0,001	24,19
C.V. (%)		32,61	32,35	30,54	32,48	7,54	36,24

**, ns: significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente, pelo teste F

Tabela 26. Resumo da análise de variância individual para os caracteres massa seca da parte área (MSPA, g.planta⁻¹), massa seca de raízes (MSR, g.planta⁻¹), comprimento total das raízes (CTR, cm.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área não infestada (Área N) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

F.V.	G.L.	MSPA	MSR	CTR	ASR	DMR	VR
Blocos	5	105,95 ^{ns}	0,284 ^{ns}	12509997,0 ^{ns}	280471,0 ^{ns}	0,013 ^{ns}	28,91 ^{ns}
Genótipos	14	34,52 ^{ns}	0,306 ^{ns}	5927603,0 ^{ns}	175465,0 ^{ns}	0,002**	28,84 ^{ns}
Resíduo	28	53,75	0,311	6408644,0	107399,0	0,002	16,86
C.V. (%)		35,62	40,06	34,79	37,26	7,69	45,55

**, ns: significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente, pelo teste F

Na análise conjunta dos dados, foram verificadas diferenças apenas nos caracteres de raiz, não sendo constatada diferença para MSPA das plantas.. Foram então constatadas diferenças significativas entre os genótipos para MSR, ASR, DMR e VR. Em relação aos ambientes, houve diferença entre eles para todos os caracteres, exceto para CTR. De forma adicional, não foi verificada interação genótipo por ambiente para nenhum dos caracteres,

havendo somente o efeito da variação dos mesmos, o que pode ser devido a uma diferença de fertilidade entre os solos.

Tabela 27. Resumo da análise de variância conjunta para os caracteres, massa seca da parte área (MSPA, g.planta⁻¹), massa seca de raízes (MSR, g.planta⁻¹), comprimento total das raízes (CTR, cm.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área não infestada (Área N) e na área infestada (Área R) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

F.V.	G.L.	MSPA	MSR	CTR	ASR	DMR	VR
Bloco/Amb	10	84,10 ^{ns}	0,38 ^{ns}	9130000,0 ^{ns}	154050,0 ^{ns}	0,013 ^{**}	25,41 ^{ns}
Genótipos (G)	14	91,60 ^{ns}	0,48 [*]	6920000,0 ^{ns}	225246,0 [*]	0,006 ^{**}	50,59 ^{**}
Ambiente (A)	1	440,45 ^{**}	4,10 ^{**}	22000000,0 ^{ns}	1287167,0 ^{**}	0,021 ^{**}	375,79 ^{**}
G x A	14	31,98 ^{ns}	0,30 ^{ns}	4142575,0 ^{ns}	126515,0 ^{ns}	0,001 ^{ns}	24,49 ^{ns}
Resíduo	140	59,91	0,23	6267760,0	126506,0	0,001	19,56
C.V. (%)		40,48	36,75	34,47	38,90	7,60	42,53

*, **, ns: significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente, pelo teste F

Uma vez constatadas as diferenças significativas para os caracteres, foram obtidas as médias dos genitores e híbridos, para efeito geral de comparação. Como não houve interação entre os genótipos e os ambientes para nenhum caráter, as médias relativas aos genitores e híbridos utilizados como porta-enxertos nos experimentos em casa de vegetação foram avaliadas somente conjuntamente e são apresentadas na (tabela 29).

Tabela 28. Médias dos genitores e híbridos, da análise conjunta para os caracteres, massa seca da parte aérea (MSPA, g.planta⁻¹), massa seca de raízes (MSR, g.planta⁻¹), comprimento total das raízes (CTR, cm.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área não infestada (Área N) e na área infestada (Área R) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	MSPA	MSR	CTR	ASR	DMR	VR
Rotam	18,75	1,48	5986,49	907,40	0,487	10,99
Rodade	18,96	1,50	7504,07	1080,66	0,458	12,45
Vietnamita	16,45	1,18	4983,44	696,29	0,441	7,79
Hawaii 7996	17,24	0,98	5303,53	685,24	0,399	7,11
TPN191	14,92	1,24	6302,65	884,08	0,434	10,00
Rotam x Rodade	20,93	1,14	6693,18	844,24	0,436	9,28
Rotam x Vietnamita	21,60	1,51	7083,70	1042,64	0,466	12,33
Rotam x Hawaii 7996	15,31	1,25	7320,40	910,85	0,420	9,82
Rotam x TPN191	21,09	1,42	6997,70	955,27	0,456	10,34
Rodade x Vietnamita	17,78	1,34	6842,15	1018,02	0,463	12,70
Rodade x Hawaii 7996	20,24	1,18	6115,88	828,57	0,429	9,00
Rodade x TPN191	19,56	1,76	8029,57	1192,00	0,471	15,06
Vietnamita x Hawaii 7996	18,21	1,20	6974,06	940,98	0,427	10,23
Vietnamita x TPN191	15,82	1,39	6496,40	920,46	0,450	10,47
Hawaii 7996 x TPN191	13,17	1,08	5802,00	787,75	0,441	8,58
Média geral	18,00	1,31	6562,35	912,96	0,445	10,41
Média genitores	17,26	1,28	6016,04	850,73	0,444	9,67
Média cruzamentos	18,37	1,33	6835,50	944,08	0,446	10,78
DMS	10,34	0,64	3346,16	475,38	0,046	6,06

Na análise conjunta entre os experimentos, podemos verificar que, em relação à MSR o genótipo de maior valor foi cruzamento Rodade x TPN191 e o menor Hawaii 7996. Em relação à área superficial e o volume de raízes, o genótipo Rodade x TPN191 também é aquele que apresentou as maiores médias, sendo os genótipos de menor área e volume os genitores Hawaii 7996 e TPN191. Embora não seja aqui realizada a descrição detalhada de cada uma das diferenças entre as médias dos genótipos, é importante notar que o genitor Rodade está entre aqueles que possuem os maiores valores para os caracteres do sistema radicular MSR, CTR, ASR, DMR e VR, o que pode ajudar a explicar sua maior eficiência como porta-enxerto, uma vez que nos experimentos de campo, este foi o genótipo que apresentou os maiores valores de CGC e algumas das médias mais elevadas para PTP e MFF. Cabe agora então, verificar os efeitos das capacidades gerais e específicas de combinação para estas características do sistema radicular dos genitores e híbridos.

Considerando que as análises para os dois tipos de solo atenderam as pressuposições para a análise conjunta, para todos os caracteres, a análise dialélica para os experimentos em casa de vegetação foi realizada a partir dos dados conjuntos dos dois tipos de solo pelo método descrito por (Venkovsky and Barriga 1992) no programa Genes (Cruz 1998). Na análise dialélica, foram então identificados efeitos significativos da CGC para os caracteres de

raiz MSR, ASR, DMR e VR. Com relação aos efeitos da CEC, foram observados efeitos significativos somente para ASR, DMR e VR.

Tabela 29. Quadrados médios das capacidades geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, o resíduo e os componentes quadráticos referentes à CGC e CEC e as interações CGC x Solo e CEC x Solo da análise conjunta para os caracteres, massa seca da parte área (MSPA, g.planta⁻¹), massa seca de raízes (MSR, g.planta⁻¹), comprimento total das raízes (CTR, cm.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área não infestada (Área N) e na área infestada (Área R) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

F.V.	G.L.	MSPA	MSR	CTR	ASR	DMR	VR
Genótipo	14	64,41 ^{ns}	0,476*	9286476,0 ^{ns}	2415577,6*	0,058**	49,17*
C.G.C.	4	75,20 ^{ns}	0,976*	10180754,0 ^{ns}	382668,4*	0,132**	93,05*
C.E.C.	10	60,09 ^{ns}	0,276 ^{ns}	8928764,6 ^{ns}	185141,3*	0,003**	31,62*
Solo	1	696,83 ^{ns}	5,018 ^{ns}	40045704,0 ^{ns}	1727492, ^{ns}	0,214 ^{ns}	444,34 ^{ns}
Gen x Solo	14	32,31 ^{ns}	0,302 ^{ns}	7399351,3 ^{ns}	156839,3 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	26,69 ^{ns}
CGC x Solo	4	9,00 ^{ns}	0,408 ^{ns}	10193152,0 ^{ns}	177554,7 ^{ns}	0,0004 ^{ns}	28,91 ^{ns}
CEC x Solo	10	41,64 ^{ns}	0,260 ^{ns}	6281831,0 ^{ns}	148553,2 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	25,80 ^{ns}
Resíduo	140	52,50	1,000	62677760,5	126702,0 ^{ns}	1,00	20,00

*, **, ns: significativo a 5%, 1% e não significativo, respectivamente, pelo teste F

Neste estudo, os genótipos Rotam e Rodade apresentaram valores positivos de CGC para MSR, porém tais valores ficam próximos de zero, sendo o efeito mais expressivo observado, o valor negativo de CGC do genitor Hawaï 7996, que para esse genótipo também foi verificado para ASR, DMR e VR. Em relação à ASR, Rotam, Rodade e TPN191 apresentaram resultados positivos para CGC, porém apenas Rodade obteve altos valores da estimativa, sendo o melhor genótipo para cruzamentos visando boas combinações para esse caráter. Para DMR o genitor de maior valor de CGC foi Rotam, embora que praticamente insignificante. Já para o caráter VR, o genótipo mais expressivo para CGC foi o genitor Rodade.

Tabela 30. Estimativas do efeito da capacidade geral de combinação (CGC) dos genitores, da análise conjunta para os caracteres massa seca de raízes (MSR, g.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área não infestada (Área N) e na área infestada (Área R) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	MSR	ASR	DMR	VR
Rotam	0,059	10,60	0,011	0,126
Rodade	0,092	87,64	0,006	1,295
Vietnamita	-0,006	-12,88	0,002	-0,003
Hawaï 7996	-0,182	-100,21	-0,021	-1,640
TPN191	0,036	14,85	0,002	0,223
D.P.	0,108	67,49	0,012	1,053

As estimativas dos efeitos da CEC (s_{ii} e s_{ij}) encontram-se na (tabela 32). Para os três caracteres com CEC significativa é possível verificar genótipos com estimativas da s_{ii} positivas e negativas. Assim, para ASR, Rotam, Rodade, Vietnamita e Hawaï 7996 apresentaram estimativas negativas e apenas TPN191 apresentou valores positivos, o que indica divergência entre os genitores, estando de acordo com os valores de heterose encontrados nas (tabela 34). Para o DMR, Rotam, Rodade e Hawaï 7996 apresentam valores negativos. Já para VR, Rodade, Vietnamita, Hawaï 7996 e TPN191 apresentaram valores negativos. A partir desses valores é possível verificar que os genitores com menores estimativas foram realmente aqueles que combinados mostraram maiores valores de heterose de seus híbridos. As estimativas das s_{ii} indicam a divergência genética do genitor em questão em relação aos outros do dialelo. Podemos ver que o genótipo Rodade, embora com as melhores estimativas de CGC para os caracteres de produção, corresponde aos híbridos que apresentam os menores valores de heterose, como pode ser visto nas (tabela 34). Já os genótipos TPN191 e Hawaï 7996, apresentando valores negativos de s_{ii} , obtiveram os híbridos com maior heterose e, portanto, devem ser os mais divergentes geneticamente para caracteres de raiz.

Tabela 31. Estimativas do efeito da capacidade específica de combinação (s_{ij}) de cada genitor com ele próprio, da análise conjunta para os caracteres área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área não infestada (Área N) e na área infestada (Área R) com *Ralstonia* spp, no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	ASR	DMR	VR
Rotam	-134,58	-0,007	0,124
Rodade	-88,67	-0,031	-3,373
Vietnamita	-22,38	0,029	-0,656
Hawaï 7996	-104,54	-0,024	-0,633
TPN191	1,54	0,019	-1,385
D.P.	57,22	0,026	1,335

Para as CEC entre os genitores, foram observados valores de s_{ij} positivos e negativos para os três caracteres que apresentaram significância. No caso da ASR, DMR e VR o híbrido que apresentou maiores valores das estimativas de s_{ij} foi Rodade x TPN191; para ASR os híbridos Rotam x Vietnamita e Vietnamita x Hawaï 7996 também apresentaram valores altos e positivos. Já para DMR Rotam x Vietnamita, Rotam x TPN, Rodade x Vietnamita, Vietnamita x Hawaï 7996 e Hawaï 7996 x TPN191 também apresentaram estimativas positivas, porém não tão elevadas. Em relação ao VR Rodade x Vietnamita e Vietnamita x Hawaï 7996 também apresentaram estimativas positivas. A estimativa de CEC evidencia a importância dos genes com efeitos não aditivos, enfatizando a importância de interações não-aditivas, resultantes da complementação gênica entre os parentais. Assim com a significância da CEC para esses caracteres fica evidente o potencial de complementação gênica entre os genitores do dialelo para os caracteres em estudo.

Tabela 32. Estimativas do efeito da capacidade específica de combinação (s_{ij}) entre genitores, da análise conjunta para os caracteres área superficial das raízes (ASR, $\text{cm}^2.\text{planta}^{-1}$), diâmetro médio das raízes (DMR, $\text{mm}.\text{planta}^{-1}$), volume das raízes (VR, $\text{cm}^3.\text{planta}^{-1}$), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área não infestada (Área N) e na área infestada (Área R) com *Ralstonia* spp., no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	ASR	DMR	VR
Rotam x Rodade	-158,99	-0,050	-2,15
Rotam x Vietnamita	126,13	0,010	-0,42
Rotam x Hawaï 7996	84,94	-0,044	-0,77
Rotam x TPN191	6,39	0,011	0,74
Rodade x Vietnamita	24,46	0,018	2,56
Rodade x Hawaï 7996	-148,26	-0,026	-1,42
Rodade x TPN191	249,44	0,033	5,39
Vietnamita x Hawaï 7996	107,40	0,014	1,81
Vietnamita x TPN191	-423,92	-0,187	-5,00
Hawaï 7996 x TPN191	-45,68	0,017	-0,72
D.P.	189,56	0,065	2,84

Com relação à heterose, de forma geral os resultados condizem com o esperado a partir das estimativas de CEC que mostraram que certos cruzamentos sobressaíram ao que se era esperado em relação aos seus genitores. Para todos os caracteres foram verificados cruzamentos que apresentaram valores positivos e negativos de heterose. Para MSPA Rotam x Vietnamita, Rodade x TPN191, Vietnamita x Hawaï 7996; Vietnamita x TPN191, Hawaï 7996 x TPN191 apresentaram valores positivos. Para MSR, os mesmos cruzamentos apresentaram estimativas positivas exceto, Hawaï 7996 x TPN191.

Para os caracteres de raiz mensurados por análise de imagens, os seguintes resultados foram verificados. Para CMR, as maiores estimativas foram para Rotam x Vietnamita, Rotam x Hawaï 7996 e Vietnamita x Hawaï 7996. Para ASR os híbridos com maiores valores foram Vietnamita x Hawaï e Rotam x Vietnamita. Em relação ao DMR, Vietnamita x Hawaï 7996, Rodade x TPN191 e Hawaï 7996 x TPN191 foram os genótipos mais expressivos. Finalmente, para o VR, Vietnamita x Hawaï 7996, Rotam x Vietnamita, Rodade x TPN191 e Vietnamita X TPN-191 foram os melhores genótipos em relação à heterose. A partir desses resultados podemos verificar que o híbrido com maior heterose em relação a todos os caracteres de raiz foi Vietnamita x Hawaï 7996 e provavelmente é o cruzamento entre os genótipos mais divergentes geneticamente para esses caracteres.

Tabela 33. Percentual de heterose em relação à média dos genitores (H_{mg}) e ao genitor superior (H_{gs}), para os caracteres, massa seca da parte área (MSPA, g.planta⁻¹), massa seca de raízes (MSR, g.planta⁻¹), comprimento total das raízes (CTR, cm.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solo coletado na área não infestada (Área N) e na área infestada (Área R) com *Ralstonia* spp, no Departamento de Genética, Piracicaba-SP

Genótipos	MSPA		MSR		CTR		ASR		DMR		VR	
	H_{mg}	H_{gs}	H_{mg}	H_{gs}	H_{mg}	H_{gs}	H_{mg}	H_{gs}	H_{mg}	H_{gs}	H_{mg}	H_{gs}
Rotam x Rodade	11,02	10,41	-23,20	-23,62	-0,77	-10,81	-15,07	-21,88	-7,77	-10,54	-20,84	-25,48
Rotam x Vietnamita	22,72	15,20	13,27	1,67	29,15	18,33	30,03	14,90	0,34	-4,40	31,25	12,16
Rotam x Hawaïi 7996	-14,94	-18,36	1,40	-15,98	29,68	22,28	14,38	0,38	-5,10	-13,71	8,50	-10,68
Rotam x TPN191	25,27	12,47	4,33	-4,06	13,88	11,03	6,65	5,28	-1,01	-6,41	-1,44	-5,88
Rodade x Vietnamita	-12,35	-6,23	-11,14	-10,90	-6,19	-8,82	-4,11	-5,80	0,34	1,20	2,54	2,03
Rodade x Hawaïi 7996	11,81	6,76	-5,00	-21,62	-4,50	-18,50	-6,16	-23,33	0,19	-6,29	-7,96	-27,72
Rodade x TPN191	-2,34	3,15	20,42	17,34	10,74	7,00	17,10	10,30	3,16	2,93	25,00	14,42
Vietnamita x Hawaïi 7996	8,08	5,60	11,59	1,92	35,59	31,50	36,22	35,14	1,64	-3,25	37,30	31,24
Vietnamita x TPN191	0,80	-3,85	14,72	11,72	15,12	3,07	16,49	4,12	2,85	2,01	17,68	4,69
Hawaïi 7996 x TPN191	-18,09	-23,61	-2,72	-13,26	-0,02	-7,94	0,39	-10,90	5,99	1,68	0,33	-14,20
D.P.	15,23	13,04	13,35	13,80	15,23	16,27	16,30	17,56	4,00	5,69	18,35	18,52

Embora a análise de todos os parâmetros de raízes seja muito importante em seu conjunto, para ajudar a explicar as diferenças de desempenho promovidas pelos porta-enxertos, é importante considerar que muitas destas variáveis podem estar relacionadas entre si, expressando alguma interdependência. Assim, foi realizada a análise de correção entre todos os caracteres de raiz avaliados, mostrando que todos eles se correlacionaram positivamente. Neste estudo, foram também coletadas e analisadas as massas frescas da parte aérea das plantas (MFPA) e as massas frescas das raízes (MFR). Contudo, foi constatado que havia uma correção elevada entre MFPA e MSPA ($r = 0,83$, $p < 0,01$), e entre MFR e MSR ($r = 0,87$, $p < 0,01$), o que justificou o uso da análise das massas secas nas análises, sendo tais valores mais precisos que os valores das massas frescas. Em relação aos caracteres de raiz fenotipados pelas análises de imagens, eles apresentaram uma magnitude da correlação muito elevada e próxima da unidade, para grande parte das combinações entre os caracteres.

Esses resultados evidenciam que, embora a utilização de novas metodologias de fenotipagem sejam interessantes e muito informativas para diversos tipos de estudo, talvez não seja necessária a avaliação de todos os parâmetros de raízes, quando a intenção for apenas selecionar genótipos superiores em programas de melhoramento. Um exemplo disso, é que a massa seca de raízes apresentou elevada correção com a maioria dos caracteres, sendo um bom indicador dos caracteres positivos do sistema radicular. Isso poderia facilitar as análises nos programas de melhoramento para desenvolvimento de porta-enxertos de tomateiro, nos quais haveria a necessidade de avaliar grande número de genótipos, concentrando os esforços para fenotipagem da massa seca das raízes. Contudo, o uso do software seria interessante quando se desejasse informações mais detalhadas de morfologia e arquitetura radicular, para estudos mais detalhados sobre o sistema radicular.

Tabela 34. Análise de correlação de Pearson entre os caracteres, massa seca da parte aérea (MSPA, g.planta⁻¹), massa seca de raízes (MSR, g.planta⁻¹), comprimento total das raízes (CTR, cm.planta⁻¹), área superficial das raízes (ASR, cm².planta⁻¹), diâmetro médio das raízes (DMR, mm.planta⁻¹), volume das raízes (VR, cm³.planta⁻¹), de plantas de tomateiros enxertados e cultivados em solos coletados nas áreas experimentais, do Departamento de Genética, Piracicaba-SP

	MSPA	MSR	CTR	ASR	DMR	VR
MSPA	-	0,71**	0,69**	0,70**	0,27 ^{ns}	0,65**
MSR		-	0,80**	0,91**	0,61**	0,92**
CTR			-	0,95**	0,25 ^{ns}	0,82**
ASR				-	0,47**	0,95**
DMR					-	0,65**

Outro ponto importante a considerar é relação entre os caracteres avaliados nas raízes e os caracteres relacionados ao desempenho produtivo nos experimentos de campo. Assim, foram realizadas correlações entre as médias dos caracteres de raízes em vasos, com as médias dos caracteres de produção em campo (tabela 36). Com isso, podemos observar que os caracteres de raiz, em sua maioria, correlacionaram-se positivamente com os caracteres de produção do experimento em campo. Assim, podemos inferir que nos experimentos com esses genótipos, existem correlações positivas e significativas entre os caracteres radiculares dos porta-enxertos (CTR, ASR e VR), com, por exemplo, a produção total por parcela (PTP), mostrando que os sistemas radiculares mais desenvolvidos, em geral proporcionam melhores desempenhos produtivos.

Tabela 35. Análise de correlações de Spearman entre as médias dos caracteres do experimento de campo (NFP, PTP, MMF) na área não infestada e das médias do experimento em ambiente protegido (MSPA, MSR, CTR, ASR, DMR, VR)

	MSPA	MSR	CTR	ASR	DMR	VR
NFP	0,18 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,66*	0,40 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,24 ^{ns}
PTP	0,59*	0,40 ^{ns}	0,68**	0,52*	0,31 ^{ns}	0,61*
MMF	0,51 ^{ns}	0,59*	0,55*	0,54*	0,61*	0,60*

Avaliando o cenário geral com base nos dados oriundos dos experimentos de campo e dos experimentos em vasos em ambiente protegido, fica evidente que as diferenças genéticas entre os genótipos usados como porta-enxertos foram capazes de influenciar os parâmetros produtivos do genótipo usado como copa. Tais efeitos benéficos dos porta-enxertos tem sido relatados por alguns autores na literatura, como por exemplo (Cantín *et al.* 2010) que, trabalhando com tomates do grupo cereja em cultivo protegido, verificaram diferenças tanto em caracteres de produção (número de frutos e produção total), como no teor de sólidos solúveis totais. Já (Naif *et al.* 2011) encontraram diferenças em caracteres de produção, porém em qualidade dos frutos, a utilização de diferentes porta-enxertos não mostrou diferenças quando utilizados dois diferentes genótipos como copa. De forma complementar, (Khah *et al.* 2006) verificaram maior produção de genótipos enxertados, em relação aos não enxertados tanto em estufa como em campo aberto. (di Gioia *et al.* 2010) demonstraram que uma boa combinação porta enxerto/copa pode aumentar tanto a produção como o vigor de variedades tomates heirloom enxertadas e (Rahmatian *et al.* 2014), trabalhando com hidroponia em tomateiro também verificaram o aumento tanto em caracteres de planta como na produção de plantas enxertadas, além de uma maior massa fresca e seca de raízes.

Segundo (Gregory *et al.* 2013), o uso de porta-enxertos é uma alternativa para o crescimento da produção sustentável, pois podem ser utilizados para o aumento da produção, através da obtenção de maiores sistemas radiculares que possibilitam a captação de mais recursos disponíveis, melhorando o crescimento em solos com impedimentos físicos e com problemas químicos como fertilidade reduzida, salinidade e metais pesados.

Contudo, nenhum trabalho havia mostrado estudos envolvendo a combinação de genitores, para estudos de parâmetros genéticos relacionados à resistência à murcha-bacteriana e desempenho produtivo.

Pela análise dialélica, foi possível constatar que o genitor Rodade apresentou boa CGC de combinação com outros genitores, contribuindo, por meio de seu componente genético aditivo, para aumentar a PTP e MFF nos cruzamentos em que este foi usado como genitor. O maior desempenho proporcionado pela enxertia da cultivar comercial sobre Rodade e sobre os híbridos obtidos por cruzamentos com esse genitor, pode ser explicado, em parte, pelo seu sistema radicular que, de acordo com as análises, mostrou possuir melhor desenvolvimento em relação aos demais.

Levando-se também em conta a maior resistência à *Ralstonia* spp. constatada no genitor Hawaii 7996 e sua boa combinação com o genitor Rodade, temos que o cruzamento Rodade x Hawaii 7996 seria o mais promissor entre todos, para gerar populações segregantes que permitam obter ganhos de seleção, combinando as características de elevada resistência à murcha-bacteriana e incremento no desempenho produtivo dos genótipos usados como copa. No entanto, é preciso considerar que neste estudo foi utilizando somente um híbrido comercial sobre todos os genótipos, não podendo-se descartar a possibilidade de interações específicas entre copa e porta-enxertos. Por esse motivo, em trabalhos futuros será importante realizar avaliações similares a estas, utilizando diferentes combinações entre genótipos usados como copa e como porta-enxerto.

4.4. Conclusões

Com base nos estudos realizados neste trabalho, envolvendo a avaliação de linhagens e híbridos como porta-enxertos de uma cultivar comercial de tomateiro, são apresentadas as seguintes conclusões:

- O genótipo Hawaii 7996 confirmou sua maior resistência à *Ralstonia* spp., na avaliação em área naturalmente infestada com o patógeno, promovendo melhora no desempenho produtivo nos híbridos, em que ele foi um dos genitores;
- O maior nível de resistência à murcha-bacteriana de Hawaii 7996 e de suas combinações híbridas, não está associado ao maior desempenho produtivo sob ausência ou baixa infestação de *Ralstonia* spp. no solo;
- O genótipo Rodade foi aquele que apresentou maior potencial nas combinações híbridas, para aumentar a produtividade da plantas e massa fresca dos frutos;
- Existem associações positivas e significativas entre o maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas usadas como porta-enxertos e a maior produtividade de frutos de tomateiro;
- A maior eficiência em promover o aumento da produtividade do genótipo Rodade e seus cruzamentos é explicada, em parte, pelo maior desenvolvimento de seu sistema radicular;
- A seleção com base no maior acúmulo de massa seca das raízes, pode ser adotada como um critério prático para seleção de genótipos mais eficientes em promover melhor desempenho para genótipos usados como copas;
- O cruzamento entre os genitores Hawaii 7996 x Rodade é o maior promissor para o desenvolvimento de genótipos que combinem elevada resistência à *Ralstonia* spp. e melhor desempenho na produção de frutos de tomateiro.

Referências

- Buuren S van and Groothuis-Oudshoorn K (2011) **mice**: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. **Journal of Statistical Software** 45.
- Cantín CM, Pinochet J, Gogorcena Y and Moreno MÁ (2010) Growth, yield and fruit quality of “Van” and “Stark Hardy Giant” sweet cherry cultivars as influenced by grafting on different rootstocks. **Scientia Horticulturae** 123: 329–335.
- Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J and Besse P (2006) Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. **Theoretical and Applied Genetics** 113: 110–121.
- Cruz CD (1998) Programa GENES: Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics) . sciELO .
- Denny T (2007) Plant pathogenic *Ralstonia* species. Springer, p. 573–644. In **Plant-associated bacteria**.

- di Gioia F, Serio F, Buttaro D, Ayala O and Santamaria P (2010) Influence of rootstock on vegetative growth, fruit yield and quality in “Cuore di Bue”, an heirloom tomato. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology** **85**: 477–482.
- Fernández-García N, Martínez V, Cerdá A and Carvajal M (2004) Fruit quality of grafted tomato plants grown under saline conditions. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology** **79**: 995–1001.
- Fox J and Weisberg S (2011) *An R Companion to Applied Regression*. Sage.
- Gregory PJ, Atkinson CJ, Bengough AG, Else MA, Fernández-Fernández F, Harrison RJ and Schmidt S (2013) Contributions of roots and rootstocks to sustainable, intensified crop production. **Journal of Experimental Botany** **64**: 1209–1222.
- Griffing B (1956) Concept of General and Specific Combining Ability in Relation to Diallel Crossing Systems. **Australian Journal of Biological Sciences** **9**: 463–493.
- Hanson PM, Wang JF, Licardo O, Hanudin, Mah SY, Hartman GL, Lin YC and Chen JT (1996) Variable reaction of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. **HortScience** **31**: 143–146.
- Hayward AC (1991) Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused By *Pseudomonas Solanacearum*. **Annu. Rev. Phytopathol.** 65–87.
- Huet G (2014) Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Plant Science** **5**: 715.
- Khah E, Kakava E, Mavromatis A, Chachalis D and Goulas C (2006) Effect of grafting on growth and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in greenhouse and open-field. **Journal of Applied Horticulture** **8**: 3–7.
- Kormos J and Kormos J (1955) Affinity in grafting. **Ann. Inst. Biol. Tihany** **23**, 161–17.
- Kunwar S, Paret ML, Olson SM, Ritchie L, Rich JR, Freeman J and McAvoy T (2015) Grafting Using Rootstocks with Resistance to *Ralstonia solanacearum* Against *Meloidogyne incognita* in Tomato Production. **Plant Disease** **99**: 119–124.
- Lebeau A, Gouy M, Daunay MC, Wicker E, Chiroleu F, Prior P, Frary A and Dintinger J (2013) Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. **Theoretical and Applied Genetics** **126**: 143–158.
- Mangin B, Thoquet P, Olivier J and Grimsley NH (1999) Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. **Genetics** **151**: 1165–1172.
- Mendiburu F de (2017) *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- Naif G, Emin Y, Perihan C, Akmak, Mine A and Yaşar K (2011) Determining of the yield, quality and nutrient content of tomatoes grafted on different rootstocks in soilless culture. **Scientific Research and Essays** **6**: 2147–2153.
- Nilsen ET, Freeman J, Grene R and Tokuhisa J (2014) A rootstock provides water conservation for a grafted commercial tomato (*solanum lycopersicum* L.) line in response to mild-drought conditions: A focus on vegetative growth and photosynthetic. **PLoS ONE** **9**: 1–22.
- Pearson ES and Hartley HO (1956) **Biometrika Tables for Staticic**. Cambridge University Press.
- Prior P, Grimault V and Schimit J (1994) Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: Present status and prospects. CAB International, p. 209–223. In Hayward AC and Hartman GL (eds) **Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent Pseudomonas solanacearum**.
- Qian Y liang, Wang X sheng, Wang D zhou, Zhang L na, Zu C long, Gao Z liang, Zhang H jun, Wang Z yong, Sun X yong and Yao D nian (2013) The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco (*N. tabacum* L.). **Euphytica** **192**: 259–266.

- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahmatian A, Delshad M and Salehi R (2014) Effect of grafting on growth, yield and fruit quality of single and double stemmed tomato plants grown hydroponically. **Horticulture, Environment, and Biotechnology** **55**: 115–119.
- Razdan MK and Mattoo AK (2007) **Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2: Tomato**. 1-24p.
- Scott JW, Wang JF and Hanson PM (2005) BREEDING TOMATOES FOR RESISTANCE TO BACTERIAL WILT, A GLOBAL VIEW. **Acta Horticulturae** 161–172.
- Silva LJ da (2010) laercio: Duncan test, Tukey test and Scott-Knott test.
- Trachsel S, Messmer R, Stamp P and Hund A (2009) Mapping of QTLs for lateral and axile root growth of tropical maize. **Theoretical and Applied Genetics** **119**: 1413–1424.
- Venkovsky R and Barriga P (1992) **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 496p.
- Wang J-F, Hanson P and Barnes JA (1998) Worldwide Evaluation of an International Set of Resistance Sources to Bacterial Wilt in Tomato. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 269–275. In **Bacterial Wilt Disease**.
- Wang JF, Ho FI, Truong HTH, Huang SM, Balatero CH, Dittapongpitch V and Hidayati N (2013) Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar “Hawaii 7996” to *Ralstonia solanacearum*. **Euphytica** **190**: 241–252.
- Wickham H (2009) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- Yaseen M (2016) DiallelAnalysisR: Diallel Analysis with R.

ANEXO

Hawaii 7996: Variedade de hábito de crescimento determinado longo oriunda do programa de melhoramento da Universidade do Havaí. Obtida provavelmente da fonte original de resistência PI127805A e utilizada internacionalmente como testemunha resistente em trabalhos com a murcha bacteriana (Wang, *et al.*, 1998). Não utilizada comercialmente devido ao pequeno tamanho de fruto e características hortícolas não desejadas. Resistente à Murcha-de-Fusarium (raças 1 e 2), suscetível a nematóides (WANG, *et al.*, 1998).

Rotam: Variedade originária da África do Sul, de hábito de crescimento determinado e resultante do cruzamento entre as linhagens L1051 e Flora-Dade. L1051 é resistente à nematóides, cancro bacteriano, e murcha bacteriana, mas tem uma baixa qualidade de frutos, particularmente no que diz respeito à firmeza e cor interna. Foi obtida a partir de uma cultivar local resistente à nematóides e da linhagem BW4 introduzida da Carolina do Norte (EUA) que, por sua vez, veio da fonte original de resistência à murcha bacteriana PI129080. Flora-Dade possui boas qualidades hortícolas e resistência à Murcha-de-Fusarium (raças 1 e 2) e murcha-de-Verticillium. As folhas são verdes escuras e de formato normal. A qualidade de frutos é excelente, especialmente no que diz respeito à firmeza. O fruto é resistente às rachaduras, é rodado para oblato, possui ombros ligeiramente verdes e atinge uma massa média de 120g. Apresenta resistência à murcha bacteriana (raça 1), Murcha-de-Fusarium (raças 1 e 2), cancro bacteriano, pinta bacteriana e nematoides *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*.

Rodade: Variedade do tipo salada, hábito de crescimento determinado e cuja origem mais provável é a África do Sul. As plantas têm um formato de arbusto de até 1,5 m de altura e apresentam um dossel denso. Os frutos têm formato globular, são uniformes em tamanho e pesam cerca de 100-150g. O potencial de rendimento é alto para uma variedade de polinização aberta. É altamente resistente à murcha-de-Verticillium (raça 1) e à murcha-de-Fusarium (raças 1 e 2), apresenta resistência intermediária contra a murcha bacteriana (raça 1) e suscetível às nematoides. A fonte de resistência para obtenção da variedade Rodade foram as cultivares BW2 e Roma VF, ambas da Universidade da Carolina do Norte, e oriunda da fonte original PI129080 (Hanson, *et al.*, 1998).

Vietnamita: Linhagem de hábito de crescimento semi-determinado. Coletada no Vietnã, porém sem informações sobre sua genealogia ou fonte original de resistência. Os frutos são ovalados, apresentam ombro verde claro, peso médio de 75g e cor vermelha escura quando maduros, apresenta ciclo de aproximadamente 140 dias. É resistente à murcha bacteriana.

TPN-191: Linhagem de crescimento determinado, derivada do cruzamento entre as variedades IPA-6 e Stevens. Apresenta resistência a nematoides e ao vírus do vira-cabeça, porém é suscetível à murcha bacteriana, cedida gentilmente pelo prof. Dr. Paulo César Tavares de Melo, do Departamento de Fitotecnia.