

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

Identificação de nova fonte de resistência ao *Tomato mottle mosaic virus*
(ToMMV) em tomateiro

César Augusto de Almeida

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2022

César Augusto de Almeida
Biólogo

Identificação de nova fonte de resistência ao *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) em
tomateiro

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **SIMONE DA COSTA MELLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2022

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

Almeida, César Augusto de

Identificação de nova fonte de resistência ao *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) em tomateiro / César Augusto de Almeida. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

41 p.

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

1. Viroses 2. *Solanum lycopersicum* L. 3. *Tobamovirus* 4. Tm-22 I.
Título

DEDICATÓRIA

A minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estender sua mão em todos os desafios e estar presente nas oportunidades e conquistas de minha jornada.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq) pela oportunidade no crescimento intelectual, profissional e pessoal.

A Professora Dra. Simone da Costa Mello pela dedicação, orientação, apoio e confiança depositados em mim durante a realização do trabalho. Meus sinceros agradecimentos e admiração.

À empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda pela oportunidade, conhecimento técnico e disponibilidade em contribuir para o conhecimento científico Brasileiro.

Agradeço especialmente a equipe de pesquisa em melhoramento de tomate, Dr. Renato de Souza Braga pela assessoria na condução do projeto e ao diretor de pesquisa Dr. Rômulo Kobori pela oportunidade concedida.

Ao pesquisador Alisson Marcos Fogaça pelos valiosos comentários no desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Dr. Jorge Alberto Marques Rezende (Esalq) e Dr. Antonio Ismael Inácio Cardoso (Unesp - Botucatu-SP) por fazerem parte do comitê de acompanhamento do meu projeto e orientações quanto a realização do trabalho.

À minha família pelo incentivo e apoio na conquista desta almejada etapa em minha vida.

A minha esposa Simone Almeida pela compreensão, ajuda, palavras de incentivo e amor dispensados a mim.

As minhas filhas Emanuelle de Almeida e Amanda Beatriz de Almeida, pelo amor e compreensão pelas horas dedicadas ao estudo e realização do projeto.

A minha neta Sophia de Almeida, que nos alegra nos momentos difíceis.

Aos meus pais pelo amor e carinho de sempre.

Ao pesquisador Dr. Alex Sandro Torre Figueiredo pelos ensinamentos e ajuda nas análises estatísticas.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste sonho.

EPÍGRAFE

"You will not become a successful breeder if you can't fully understand and completely dominate all the techniques and how to grow well your target crop"

*Clint E. Peterson
Universidade de Wisconsin*

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Doenças virais no tomate.....	13
2.2 <i>Tobamovirus</i>	13
2.3 <i>Tomato mottle mosaic virus</i> (TOMMV).....	14
2.4 Resistência genética a diferentes <i>tobamovirus</i>	15
2.5 Transferência de resistência genética em programas de melhoramento de plantas.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Busca por uma nova fonte de resistência ao TOMMV.....	19
3.1.1. <i>Screening</i> de linhagens para TOMMV.....	19
3.1.2. Validação de resistência ao tommv com plantas diferenciadoras.....	21
3.1.3. Avaliação da presença dos genes TM-1, TM-2 E TM-2 ²	21
3.2. Controle genético da resistência.....	22
3.2.1. Proposição e teste da hipótese do controle genético do caráter.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Busca por novo gene de resistência ao TOMMV.....	27
4.2. Controle genético do caráter do novo gene de resistência.....	29
5 CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS.....	37
APÊNDICE.....	41

RESUMO

Identificação de nova fonte de resistência ao *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) em tomateiro

A espécie de vírus *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) pertencente ao genero *Tobamovirus* foi recém identificada no Brasil, e apenas um gene conhecido é capaz de expressar caráter de resistência em genótipos comerciais de tomate. Portanto, é necessário identificar novas fontes de resistência genética ao ToMMV para reduzir o risco da dependência de apenas um gene que pode ser superado pelo vírus e para aumentar a segurança dos sistemas de produção de tomate. Neste sentido, o presente trabalho objetivou identificar linhagens de tomate que apresentem resistência ao ToMMV através da confirmação em plantas diferenciadoras, utilizar marcadores moleculares para descartar linhagens com resistência por genes conhecidos e estudo de herança de um novo gene de resistência ao ToMMV identificado para orientar a transferência para híbridos comerciais. Inicialmente, 250 linhagens de tomate da detentora Sakata Seed Sudamerica Ltda. foram inoculadas mecanicamente com ToMMV previamente isolado, identificado e multiplicado em plantas de *N. tabacum* cultivar "TNN". Destas linhagens, 11 não expressaram sintomas após inoculação e 7 foram confirmadas como resistentes por plantas diferenciadoras de *N. tabacum* cultivar Xanthii. Estas plantas foram novamente cultivadas e foram extraídos extratos foliares que foram levados ao laboratório de Biotecnologia da Sakata Seed Sudamerica Ltda., onde foram realizados os testes com marcadores moleculares através de RT-PCR para o gene Tm-1 e PCR por CAPS para os genes Tm-2 e Tm-2². Nesta etapa foi reconhecida uma linhagem selvagem (*Solanum pinnellii*) identificada com o número 11188 que apresentou resistência ao ToMMV, porém sem expressar os genes já conhecidos. Tal material foi utilizada para o estudo de herança genética e foi realizada a hibridação entre o material genético 11188 que é resistente ao vírus e 8163 que é utilizada nos programas de melhoramento da Sakata e é suscetível ao vírus. Foram obtidas as gerações F₁, F₂, RC₁ e RC₂, os quais foram inoculados e avaliados quanto a sua resistência ao ToMMV através de plantas diferenciadoras. Foram testadas duas proposições de controle genético, sendo a primeira de um gene com interação alélica de dominância e a segunda de dois genes com interação não alélica de epistasia. Ao realizar o teste de χ^2 com os dados observados, o resultado apontou para que é plausível o controle genético com dois genes e epistasia, porém, devido a outras possibilidades de controle genético existentes não se pode confirmar se este é a forma de controle do fenótipo. Então, o futuro deste trabalho é o aumento do número de testes de proposições e o teste da terceira geração filial (F₃) para deixar o teste de hipóteses mais robusto. Próximo passo deste trabalho é o desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação precoce do gene de resistência nos programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: Viroses, *Solanum lycopersicum* L., *Tobamovirus*, Tm-2²

ABSTRACT

Identification of a new source of resistance to *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) in tomato

The Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) species belonging to the *Tobamovirus* genus was recently identified in Brazil, and only one known gene is able to express resistance character in commercial tomato genotypes. Therefore, it is necessary to identify new sources of genetic resistance to ToMMV to reduce the risk of relying on only one gene that can be overcome by the virus and to increase the safety of tomato production systems. In this sense, the present work aimed to identify tomato strains that present resistance to ToMMV through confirmation in differentiating plants, to use molecular markers to discard strains with resistance by known genes and to study the allelic interaction of a new resistance gene to ToMMV identified to guide the transfer to commercial hybrids. Initially, 250 tomato strains from the holder Sakata Seed Sudamerica Ltda. were mechanically inoculated with ToMMV previously isolated, identified and multiplied on *N. tabacum* cultivar "TNN" plants. Of these strains, 11 did not express symptoms after inoculation and 7 were confirmed as resistant by differentiating plants of *N. tabacum* cultivar Xanthii. These plants were grown again and leaf extracts were taken to the Biotechnology laboratory of Sakata Seed Sudamerica Ltda. where molecular marker tests were performed using RT-PCR for the Tm-1 gene and PCR by CAPS for the Tm-2 and Tm-2² genes. At this stage, a wild strain (*Solanum pinnellii*) identified with the number 11188 was recognized, which showed resistance to ToMMV, but without expressing the genes already known. This material was used for the study inheritance and hybridization was performed between the genetic material 11188 that is resistant to the virus and 8163 that is used in the breeding programs of Sakata and is susceptible to the virus. The F₁, F₂, RC₁ and RC₂ generations were obtained, which were inoculated and evaluated for their resistance to ToMMV through differentiating plants. Two genetic control propositions were tested, the first being one gene with allelic dominance interaction and the second being two genes with non-allelic epistasis interaction. By performing the χ^2 test with the observed data, the result pointed out that genetic control with two genes and epistasis is plausible, however, due to other existing genetic control possibilities, it cannot be confirmed whether this is the way to control the phenotype. The next step of this work is to increase the number of proposition tests and to test the third filial generation (F₃) to make the hypothesis testing more robust. Also, the future of this work is the development of molecular markers for early identification of the resistance gene in breeding programs.

Keywords: Viruses, *Solanum lycopersicum* L., *Tobamovirus*, Tm-2²

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proposição de controle genético para a expressão do fenótipo de resposta ao ToMMV com um gene.....	24
Tabela 2 – Proposição de controle genético para a expressão do fenótipo de resposta ao ToMMV com dois genes.....	24
Tabela 3 – Hipótese de proporções fenotípicas e genotípicas das gerações das plantas de tomate para o caráter de resistência ao ToMMV com um gene.....	25
Tabela 4 – Hipótese de proporções fenotípicas e genotípicas das gerações das plantas de tomate para o caráter de resistência ao ToMMV com dois genes.....	26
Tabela 5 – Número de plantas observadas de <i>N. tabacum</i> cv. Xanthii que expressaram ou não sintomas após a inoculação com os extratos foliares das linhagens não sintomáticas.....	28
Tabela 6 – Presença de genes de resistência identificados através de marcadores moleculares das linhagens resistentes ao ToMMV.....	29
Tabela 7 – Estimativa de χ^2 para testar a hipótese de distribuição fenotípica expressa por um gene após a inoculação de ToMMV.....	32
Tabela 8 – Estimativa de χ^2 para testar a hipótese de distribuição fenotípica expressa por dois genes após a inoculação de ToMMV.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAS	(Basic Local Alignment Search Tool): Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
CAPS	(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences): Sequências Polimórficas Amplificadas Aliviadas
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
dNTP	deoxinucleotídeos
DNA	ácido desoxirribonucleico
ISO	International Organization for Standardization
kDa	quilo Dalton
kb	quilo bases
PCR	(Polymerase Chain Reaction): Reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucleico
TMV	Tobacco Mottle Virus
ToMV	Tomato Mottle Virus
ToMMV	Tomato Mottle Mosaic Virus

1. INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção de hortaliças, o tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) figura como um dos principais produtos pois seu consumo faz parte da maioria das culturas do mundo, seja em forma de saladas, molhos, extratos, como acompanhamento ou prato principal. No ranking global de produção de tomate realizado em 2020 pela Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, foram registrados 175 países produtores de tomate e o Brasil está em décimo colocado com produção de 3,7 milhões (FAOSTATS, 2020). O tomate é o segundo principal produto da cadeia hortícola brasileira e sua produção está difundida em todas as regiões do país, totalizando uma área de 51.960 ha em que o estado de maior produção é São Paulo, participando com 10.089 hectares (BRASIL, 2020).

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é acometido a vários estresses bióticos que reduzem a produtividade e qualidade dos frutos, cujos agentes biológicos são insetos, fungos, bactérias, nematóides e vírus. Entre os vírus, o gênero *Tobamovirus* leva a sintomas de mosaico e deformações da planta. Uma nova espécie do gênero *Tobamovirus* tem chamado atenção por causar rápida necrose nas folhas das plântulas e distorções nas plantas adultas de tomate, ameaçando os sistemas de produção de tomate. A espécie foi classificada como *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) e foi primeiramente descrita no México em 2013 e posteriormente em vários outros locais do mundo, como nos Estados Unidos, Espanha, Israel e China. O ToMMV foi descrito no Brasil em 2018 no município de Capão Bonito, no estado de São Paulo, porém, relatos indicam que sua ocorrência iniciou em 1992 no país (NAGAI, 2017; NAGAI et al., 2019).

A transmissão local do *Tobamovirus* ocorre de forma não-vetorial, por exemplo, no momento dos tratamentos culturais durante o transplante, amarrão e desbrota ou através de danos mecânicos e contatos entre as plantas, provocados pela ação dos ventos. A disseminação entre locais de cultivo de tomate ocorre principalmente por sementes e mudas contaminadas e a melhor forma de controle deste gênero de vírus é a utilização de genótipos resistentes e sementes de origem idôneas (INOUE-NAGATA; LIMA, 2021).

Alguns genes do tomate são descritos quanto a sua capacidade de conferir resistência a algumas espécies de *Tobamovirus*, como os genes Tm-1 e Tm-2. Recentemente, Nagai (2017) e Nagai et al. (2019) sugeriram que a variante alélica Tm-2², a qual confere resistência ao *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Tabaco mosaic virus* (TMV) com duas espécies de importância econômica para o tomate, capaz de conferir resistência ao ToMMV. Porém, por ser um vírus recentemente descrito no país, é possível que ocorra outras fontes de resistência ainda não descritas.

Uma característica da presença de *Tombomovirus* em plantas de tomate, que afeta o melhoramento genético e a descoberta de novos genes, é a ausência de sintomas nas plantas cultivadas em regiões com elevadas temperaturas, , dificultando a identificação de linhagens resistentes. Dessa forma, a utilização de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum cv. Xanthii*) como plantas diferenciadoras auxilia no diagnóstico da doenças em que estas são inoculadas com extrato de folhas de tomate com suspeita de contaminação por ToMMV. Esta técnica auxilia na confirmação da doenças, uma vez que esta espécie expressa o vírus em maior intensidade e em todos os ambientes.

O presente trabalho possui por hipótese que há uma fonte genética não descrita que confere resistência ao ToMMV e assim objetiva de forma geral encontrar uma fonte genética não descrita para o controle de uma espécie viral de importância econômica tanto para o Brasil quanto para o mundo. De forma específica, o trabalho objetiva i) a identificação de linhagens que apresentem resistência ao ToMMV confirmada por plantas diferenciadoras, ii) utilizar marcador molecular para descarta linhages com resistência por genes já conhecidos e iii) estudar a interação alélica do novo gene de resistência ao ToMMV para orientar a transferência deste gene para híbridos comerciais. Espera-se que os resultados alcançados auxiliem no desenvolvimento de material genético resistentes ao TOMMV, aumentando a segurança alimentar através da redução do risco do ToMMV na produção de tomate, corroborando com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas número 2 – Fome Zero e Agricultura Sustentável.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doenças virais no tomate

O tomate tem alta relevância socioeconômica no Brasil, porém o seu cultivo é desafiador devido a a sua suscetibilidade a muitas doenças, o que leva ao uso mais frequente de produtos fitossanitários, elevando o custo de produção. O clima tropical, os sistemas de cultivo e a grande quantidade de vetores favorecem o desenvolvimento das doenças e sua disseminação, além de muitas delas serem transmitidas pelas sementes e mudas, resultando na expansão das doenças entre as regiões produtoras. Também, a entrada de novas doenças no país pode ocorrer pela importação de sementes. As melhores estratégias para proteger os sistemas de produção de tomate no Brasil são através de ferramentas de identificação das doenças, sementes e mudas isentas de patógenos, resistência genética e barreiras quarentenárias (INOUE-NAGATA; LIMA, 2021).

Em levantamento de cultivos nacionais entre 2008 a 2011, em 144 sistemas de produção de tomate, localizados no Distrito Federal e nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina, Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco, Quezado-Duval et al. (2013) observaram que aproximadamente 80% das lavouras de tomate de mesa e 70% das lavouras de tomate para a indústria apresentavam doenças causadas por vírus, o que evidencia a importância das doenças virais para a cultura.

As famílias de vírus que causam doenças na cultura do tomate no Brasil são *Geminiviridae*, *Closteroviridae*, *Tospoviridae*, *Potyviridae*, *Bromoviridae*, *Tymoviridae* e *Virgaviridae* (INOUE-NAGATA; LIMA, 2021). Para a identificação dos vírus causadores de doenças realizadas por Quezado-Duval et al. (2013), os autores utilizaram sorologia para a maioria das famílias, sendo apenas utilizada a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) para *Geminiviridae*.

2.2. Tobamovirus

O gênero *Tobamovirus* contém o maior número de representantes da família *Virgaviridae*, sendo 37 espécies conhecidas (ICTV, 2022). Este gênero é importante por conter o *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Tomato mosaic virus* (ToMV), que são dois agentes infecciosos com grande importância econômica para o Brasil (INOUE-NAGATA; LIMA, 2021), em que o TMV foi o primeiro vírus fitopatogênico cristalizado e, portanto, sendo extensivamente estudado. Vírus deste gênero não é transmitido por vetores, mas sim por contato mecânico entre as plantas e

através das sementes sem afetar o embrião. Outra característica importante é a sua alta tolerância a temperaturas elevadas, pois sobrevive nos ambientes de produção vegetal por longo período em temperaturas superiores a 40 °C, pois sua temperatura de inativação é de 90 °C, (LI *et al.*, 2013; ADAMS *et al.*, 2017; ICTV, 2022).

A morfologia dos vírions é de formato de bastão rígido, com cerca de 18 nm de diâmetro e largura comum de 300 a 310 nm. Este gênero é o único da família que tem genoma não segmentado de tamanho de 6,3 a 6,6 kb e com comprimento 5'-NTR aproximado de 70 nucleotídeos contendo muitas repetições AAC, e poucos nucleotídeos G traduzindo quatro proteínas diferentes, sendo uma proteína estrutural e três proteínas não estruturais. A proteína estrutural tem massa de 17 a 18 kDa, uma proteína não estrutural de massa de 124 a 132 kDa é formada por um códon de parada UAG e outra de massa de 181 a 189 kDa é formada pela mesma sequência sob leitura contínua. A última proteína não estrutural apresenta massa de 28 a 31 kDa e é requerida para o movimento de longas distâncias e para o movimento entre células (ICTV, 2022).

Este gênero é importante para a cultura do tomate no Brasil, pois as espécies afetam o desenvolvimento das plantas, reduzem a produtividade e a qualidade dos frutos. Uma implicação importante é que os sintomas causados entre as espécies de *Tobamovirus* são muito similares, em que o hospedeiro expressa clorose, mosaico, distorções e necrose. Também, em ambientes sob altas temperaturas, as plantas se mantêm assintomáticas, dificultando o isolamento da doença e o seu avanço (INOUE-NAGATA; LIMA, 2021).

Muitas espécies do gênero *Tomabovirus* eram consideradas como cepas do TMV. Com a utilização do sequenciamento de dados nucleotídeos foi possível identificar diferentes espécies causadoras de doenças em tomateiro, permitindo o melhoramento genético dos hospedeiros. Os critérios para a demarcação de espécie são a similaridade do genoma total de mais de 90%, amplitude de hospedeiros, relação de antigênicos na biossíntese da capsula e relação de membros da espécie (ICTV, 2020). Atualmente o GenBank, banco de dados de sequenciamento de nucleotídeos, contém sequenciamentos genéticos das diferentes espécies em diferentes localidades, incluindo sequenciamentos que permitem a diferenciação das espécies na América do Sul (NAGAI, 2017; NAGAI *et al.*, 2018; ICTV, 2020).

2.3. Tomato mottle mosaic virus (ToMMV)

Em 2013 a espécie *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) do gênero *Tobamovirus* foi primeiramente descrita no México (LI *et al.*, 2013) e brevemente em outros países como Estados

Unidos (WEBSTER *et al.*, 2014), China (LI *et al.*, 2014), Israel (TURINA; GERAARS; CIUFFO, 2016) e Espanha (AMBRÓS *et al.*, 2016). No Brasil sua primeira identificação foi em 2017 por Nagai (2017), em isolados coletados no município de Capão Bonito no estado de São Paulo em 1992, e mantidos desidratados em CaCl₂.

A suspeita de Nagai (2017) de uma nova espécie de *Tobamovirus* iniciou pela observação de partículas em formato de bastão observadas em microscopia eletrônica de transmissão, reação com antissoro de ToMV e, por fim, semelhança da sequência nucleotídica da capa proteica do ToMMV, identificado no México e cadastrado no GenBank sob o código KF477193. O genoma descrito no Brasil foi depositado no GenBank com o código MH128145.

A confirmação da espécie em amostras do ano de 1992 no país levantou a possibilidade de confusão na contabilização da incidência de ToMV com ToMMV, devido a identificação por antissoro ser reagente a ambos, podendo ter resultado em atrasos no melhoramento genético de plantas. Nestes sentido, Nagai *et al.* (2018) discutem a importância da utilização do método de PCR e a possibilidade dos efeitos do ToMMV terem sido negligenciados devido ao seu desconhecimento.

Outro fator importante na disseminação do ToMMV no Brasil é a importação de sementes provenientes principalmente do Chile, China, Tailândia e Índia (QUEZADO-DUVAL *et al.*, 2013), visto que o vírus tem sido relatado em alguns destes países e barreiras quarentenárias têm detectado a presença do vírus em lotes de sementes de outras famílias além das *Solanaceae*. Por exemplo, na Espanha, Lovelock *et al.* (2020) e Bertomeu (2021) detectaram através de PCR a presença de ToMMV em lotes de sementes importadas de tomate e de pimenta (*Capsicum annuum*) provenientes de Israel, China e Estados Unidos.

2.4. Resistência genética a diferentes *Tobamovirus*

As resistências são classificadas em acordo com o modo de interação patógeno-hospedeiro. São dois os mecanismos de resistência genética, a resistência dominante e a recessiva. A primeira é conferida pela interação incompatível do gene de resistência com o gene de virulência. A maioria dos genes de resistência dominantes contém proteínas que se ligam aos polos de ligação dos nucleotídeos ou nas leucinas, resultando em respostas de hipersensibilidade no hospedeiro. Já a resistência recessiva apresenta como mecanismo de ação para a não permissão de instalação do vírus no hospedeiro, devido a ausência de fatores específicos de expressão. Portanto, a resistência recessiva é mais durável que a dominante, pois é mais difícil que ocorra a adaptação do vírus aos fatores não específicos (GALVEZ *et al.*, 2014).

A resistência às doenças causadas por TMV e ToMV foram identificadas em *L. peruvianum* e introduzida em *L. esculentum* através dos genes Tm-1, Tm-2 e Tm-2². A resistência conferida pelo gene Tm-1 foi superada pelo ToMV e foi demonstrado que a razão é pelo RNA-polimerase dependente de RNA ser o gene correspondente de virulência (LANFERMEIJER; WARMINK; HILLE, 2005). A resistência dos genes Tm-2 e Tm-2² ocorre pela capacidade em detectar a proteína de movimentação do vírus que tem massa de 28 a 31 kDa, então induzir a reação de defesa na planta. Weber *et al.* (2004) observaram sintomas de necrose em plantas com genes de resistência que supostamente foram causadas por ToMV. Os autores então relataram que o gene Tm-2 não era mais capaz de conferir reação imune na planta por não reconhecer a proteína de movimentação, enquanto o gene Tm-2² possuía a capacidade da identificação e da indução da resposta imune. Já os autores Lanfermeijer, Warmink e Hille (2005) compararam o gene Tm-2 com o Tm-2² e observaram que eles apresentam pequenas diferenças, mas que o Tm-2² contém quatro aminoácidos que resultam na habilidade em manter a resistência. Salienta-se que na época destes estudos não havia o conhecimento do ToMMV, gerando dúvidas se a quebra de resistência do gene Tm-1 e Tm-2 foi realmente causada por ToMV.

Mais tarde, Nagai *et al.* (2019) estudaram a possibilidade de eventos de recombinação do ToMV no surgimento do ToMMV e o envolvimento do gene Tm-2² na sua resistência e puderam concluir que não houve eventos de recombinação e que o gene confere resistência ao ToMMV. Os autores também estudaram aos híbridos nacionais com resistência ao ToMMV e encontraram apenas um híbrido comercial com resistência parcial a esta espécie de vírus. Assim, entende-se que a maioria dos híbridos de tomate utilizadas nos sistemas de produção de tomate apresentam suscetibilidade ao novo vírus, e não são conhecidos genes que confirmam resistência total a ele. Portanto, estudos que busquem novos genes eficientes no combate ao ToMMV são extremamente necessários.

2.5. Transferência de resistência genética em programas de melhoramento de plantas

A presente sessão é baseada nos livros de Cruz, Regazzi e Carneiro (2012), Ramalho *et al.* (2012) e Turchetto-Zolet (2017) e apresenta a explanação de como orientar a transferência de genes de resistência a vírus através da determinação do controle genético e as vantagens da utilização de marcadores moleculares neste processo.

Uma vez identificado um gene de resistência, os programas de melhoramento de plantas buscam a transferência deste gene a uma linhagem que já possua características de interesse. A etapa mais importante neste processo é a proposição do controle genético da resistência, o qual

orienta o processo de transferência do gene para os híbridos comerciais. Para isso, empregam-se os mesmos procedimentos utilizados por Mendel, quando estabeleceu os princípios da existência de fatores segregantes e de forma independente.

Inicia-se o processo através da formulação das proposições de controle genético para um, dois ou mais genes e a proposição de interação alélica ou não alélica. A interação alélica é aquela que o efeito do gene depende da composição alélica, ou seja, a ação combinada entre os alelos, já a interação não alélica, também conhecida por epistasia, é a ação da combinação de genes e alelos para o controle da expressão fenotípica e pode ser do tipo aditiva (homozigoto x homozigoto), tipo aditiva e dominante (homozigoto x heterozigoto ou heterozigoto x homozigoto) e dominante (heterozigoto x heterozigoto ou homozigoto x homozigoto) sendo a relação de dominância em que o homozigoto é formado por alelos recessivos a mais frequente para fenótipo de resistência a viroses. A interação não alélica em que um gene inibe a expressão de outro gene é conhecida como epistasia e é frequente para fenótipos resistentes a viroses.

O cruzamento entre plantas de caráter contrastante e com genes homogêneos é realizado a fim de observar a expressão fenotípica. Este primeiro cruzamento é chamado de hibridação e resulta na primeira geração filial. Nesta geração é possível observar se os parentais estavam em homozigose, pois seu cruzamento deve gerar um heterozigoto para o caráter de interesse. A autofecundação da primeira geração filial irá resultar na segunda geração filial, na qual ocorre a segregação dos alelos e diferentes expressões fenotípicas, que são resultados do número de genes e interação alélica ou epistasia. Também, são realizados retrocruzamentos, ou seja, o cruzamento da primeira geração filial com os parentais, e da segunda geração filial com os parentais, sendo que nestes cruzamentos também ocorrem segregações, auxiliando no levantamento de dados para testar as proposições.

Após a obtenção de proposições de controle genético e das observações, realiza-se a análise estatística. Nesta etapa é utilizado o teste de χ^2 , que avalia os desvios entre os dados esperados em conformidade com as proposições com os observados nos cruzamentos e retrocruzamentos. A hipótese de nulidade do teste trata da plausibilidade da proposição de controle genético formulada, enquanto a hipótese alternativa indica que a proposição é pouco provável.

Existem diferenças importantes nos programas de melhoramento de plantas quando o controle genético é dominante ou recessivo, por exemplo, no método de transferência de genes por retrocruzamentos o processo de retrocruzamentos é contínuo para interação alélica de dominância e alelo de interesse dominante, enquanto a transferência de alelos recessivos envolve retrocruzamentos, autofecundação e testes de progênie para maior eficiência de transferência.

As técnicas de marcadores moleculares é uma solução que aumenta a eficiência da transferência de genes, principalmente aqueles envolvidos na expressão de resistência a vírus. Durante o programa de melhoramento de plantas há demanda de identificação de sintomas na planta de interesse, o que pode levar a erros quando os sintomas não são expressos, ou a demanda da utilização de plantas diferenciadoras, que são plantas que expressam rapidamente sintomas de fácil identificação e são inoculadas com o extrato da planta que se possui o interesse de avaliar a presença do patógeno. É nesta etapa que se pode utilizar um marcador molecular para aumentar a eficiência do processo e entre as tecnologias estão disponíveis aqueles marcadores moleculares baseados no método de sequências polimórficas, em restrição, em sequenciamento, microssatélites, polimorfismo ou hibridação de microarranjos.

A grande vantagem da utilização do marcador molecular é a identificação precoce da presença do gene de resistência, podendo ser identificado ainda na semente ou na plântula. Isto acelera a seleção de resistentes no programa melhoramento de plantas e viabiliza a transferência do gene de interesse, de forma mais rápida para as linhagens comerciais e, portanto, para o sistema de produção de tomate.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Busca por novo gene de resistência ao ToMMV

Os experimentos foram conduzidos em ambiente protegido, na Estação Experimental de Pesquisa, pertencente a Sakata Seed Sudamerica Ltda., detentora do germoplasma de tomate, localizada no município de Bragança Paulista (SP). O local dos experimentos encontra-se a 834 m de altitude nas coordenadas geográficas 23°00'45" S e 46°35'25" O. O clima local é classificado como Cfa segundo Koppen-Geiger (BECK *et al.*, 2018), caracterizado como subtropical úmido com precipitação anual média de 1509 mm e temperatura média anual de 19,8°C.

3.1.1. *Screening* de linhagens para ToMMV

Inicialmente, realizou-se o *screening* quanto a resistência ao ToMMV de 250 linhagens de tomate dos segmentos *Grape*, *salada*, *indústria*, *saladete* e *selvagem*. Para isso, foram semeadas 30 sementes, para obtenção de 18 mudas de cada linhagem, em bandejas de 162 células, contendo fibra de coco. As bandejas foram mantidas em estufa agrícola de 50 m de comprimento, 6,4 m de largura e 4,5 m de altura, coberta com filme plástico antivírus (Ginegar) e as laterais com telas antiafídeos, além de tela termorefletora na base do telhado. A partir do décimo quinto dia foram iniciadas as fertirrigações com fertilizante hidrossolúvel 13-40-13 (Kristalon) na dosagem de 1g L⁻¹. Aos 25 dias após a semeadura, 18 mudas de cada linhagem foram transplantadas em sacolas plásticas de 800 mL contendo substrato comercial à base de Tropstrato Vida Verde V6).

O isolado de ToMMV foi originário da região de Uberlândia (SP). O sequenciamento genético foi realizado no laboratório de Biotecnologia da Sakata Seed Sudamerica Ltda., o qual contém o selo ISO 9001(International Organization for Standardization). Primeiramente foi realizada a extração do RNA utilizando a metodologia Invitrogen® segundo as especificações do fabricante e que pode ser encontrada em Bitencourt *et al.* (2011). Foi adicionado 1 mL de Trizol® ao isolado e foi homogeneizada a solução em agitador de tubos vortex durante um minuto e, posteriormente, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos para dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio a 4 °C e as amostras foram novamente homogeneizadas por um minuto e deixadas em temperatura ambiente por mais 3 minutos para incubação. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2 mL. O RNA foi precipitado através da adição de 500 µL de isopropanol, homogeneizado por inversão durante 2

minutos e mantidos em temperatura ambiente por mais 8 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. Neste momento o RNA se torna visível como precipitado e o sobrenadante foi descartado para então realizar a lavagem com etanol 75%. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi seco por 10 minutos a temperatura ambiente e depois ressuspensionado em 50 µL de água em agitador.

A transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi iniciada pela obtenção do DNA complementar (cDNA,) utilizando a enzima de transcriptase reversa M-MLV-RT do kit Sigma®, segundo as especificações do fabricante. Foram colocados de 4 a 8 µL de RNA, 2 µL de ACP-primer e de 10 a 14 µL de água. O produto foi colocado em termociclador modelo Eppendorf Mastercycler (Thermofisher), programado para 10 minutos a 70 °C e 1 minuto a 4 °C. Posteriormente, foram adicionados 21 µL de água, 5 µL de tampão da enzima M-MLV-RT, 2 µL de dNTP, 1 µL de inibidor RNase e 1 µL de enzima M-MLV-RT. As reações foram novamente colocadas em termociclador programado para 42 °C por 50 minutos e depois 94 °C por 3 minutos e finalizado a 4 °C.

O PCR foi realizado utilizando 2,5 µL cDNA, 0,75 µL de MgCl₂, 5 µL de tampão PCR, 4 µL de dNTP e adicionados 2 µL de primers sintetizados na empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda. A solução resultante foi colocada em termociclador programado para 40 ciclos de desnaturação por 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto, finalizando em 4 °C. O produto foi sequenciado diretamente utilizando oligonucleotídeos iniciadores em sequenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Thermofisher). O alinhamento das sequências foi realizado no software Se-Al versão 1.0 alpha e a sequência foi comparada com o banco de dados contido no GenBank utilizando o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Obteve-se correspondência de 99% da sequência nucleotídica com ToMMV.

O inóculo foi aumentado no hospedeiro *N. tabacum* cultivar “TNN”, que manifesta o sintoma de mosaico nas folhas e apresenta alta taxa de multiplicação. As plantas das linhagens foram inoculadas com o vírus ToMMV no departamento de fitopatologia da Sakata Seed Sudamerica Ltda. através de inoculação artificial (ALFENAS; MAFIA, 2007). Para isso, folhas sintomáticas do hospedeiro foram maceradas na proporção de 1 g de tecido por 60 ml de tampão fosfato pH 7,0 e o extrato foi mantido no gelo. As plantas de tomate foram inoculadas quando foi observada a 1ª folha definitiva (entre 30 e 35 dias após a semeadura), primeiramente realizando a abrasão dos tecidos foliares com papel abrasivo de 600 mesh e posteriormente contaminando a planta através do contato com o algodão molhado na suspensão viral. Para

uniformizar a inoculação, as folhas foram friccionadas por três a quatro vezes com algodão, que continha o inóculo e as plantas receberam uma nova inoculação após 48 horas da primeira inoculação para minimizar a possibilidade de escape.

Após 30 dias da inoculação foi realizada a avaliação visual quanto a presença de sintomas, em que as plantas que apresentavam mosaico foram classificadas como resistentes e as que apresentavam o sintoma foram classificadas como susceptíveis. Aquelas resistentes foram selecionadas para a próxima etapa experimental.

3.1.2. Validação de resistência ao ToMMV com plantas diferenciadoras

Das plantas que não apresentaram sintomas visuais, foram extraídas amostras compostas das folhas do ponteiro e da base dos indivíduos para obtenção do extrato foliar através de maceração e diluição de 1 g de tecido em 60 ml de tampão fosfato pH 7,0, que foi mantido em gelo para então ser realizada a inoculação artificial (ALFENAS; MAFIA, 2007). Os extratos foram inoculados em plantas da espécie *N. tabacum* cv. Xanthii, que serviram como plantas diferenciadoras e que apresentaram sintoma de lesão necrótica na presença de ToMMV, o que facilitou a visualização para constatar que a linhagem de tomate era realmente resistente e não apenas assintomática. A inoculação ocorreu da mesma forma que nas linhagens de tomate, através de abrasão dos tecidos, contaminação em contato com algodão molhado no extrato com vírus e repetição, após 48 h. Após 10 dias da inoculação foi realizada a avaliação visual. As plantas diferenciadoras que não apresentaram sintomas indicaram a resistência das linhagens de tomate ao ToMMV, as quais foram selecionadas para a próxima etapa.

3.1.3. Avaliação da presença dos genes Tm-1, Tm-2 e Tm-2²

As análises com marcadores moleculares para determinar a presença dos genes de resistência foram realizadas no laboratório de Biotecnologia da Sakata Seed Sudamerica Ltda. As sementes das linhagens que tiveram a resistência ao ToMMV confirmada pelas plantas diferenciadoras foram novamente cultivadas para evitar contaminação quando da extração de DNA, que foi utilizado para a detecção dos genes de resistência. A extração foi realizada pela metodologia Invitrogen®, conforme realizado para a extração do RNA e segundo as especificações do fabricante e nesta etapa foram utilizados os cotilédones das plântulas (BITENCOURT, 2011).

O DNA foi amplificado via PCR para os genes Tm-1, Tm-2 e Tm-2² com *primer* da empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda. Para o gene Tm-1 o processo de extração e análise foi feito através de PCR em tempo real (RT-PCR) e para os genes Tm-2 e alelo Tm-2² foram realizados através de PCR convencional por sequências polimórficas amplificadas clivadas (CAPS) utilizando-se a enzima Hinf (TURCHETTO-ZOLET, 2017).

3.2. Controle genético da resistência

Após a detecção da linhagem resistente, procedeu-se o estudo do controle genético assim como descrito em Ramalho *et al.* (2012). Foi realizado o cruzamento do material genético resistente 11188 com a linhagem elite 8163 contrastante por ser susceptíveis ao vírus. Para a realização dos cruzamentos, os genitores foram cultivados em estufa no Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda. Foram utilizadas 10 plantas do material genético susceptível (P₁), como genitores femininos e 5 plantas da linhagem resistente (P₂) como doador de pólen. A partir do início do florescimento, o pólen das flores do genitor masculino foi coletado e armazenado em gerbox, em baixa temperatura e umidade. Os cruzamentos foram realizados por emasculação e em seguida polinização dos botões florais do genitor feminino, no período da manhã, entre 8 e 9 h. As flores polinizadas artificialmente foram marcadas com lãs coloridas, a fim de se fazer a identificação nos frutos. No estágio de maturação fisiológica, caracterizado por 100% de coloração vermelha nos frutos, foram coletadas as sementes da geração F₁ de forma manual, as quais foram fermentadas por 48 h, lavadas, secas à temperatura ambiente e armazenadas em câmara fria na temperatura de 15 a 20 °C e umidade de 25 a 40%.

Para a obtenção dos retrocruzamentos, RC₁ (P₁ x F₁) e RC₂ (F₁ x P₂), 10 plantas do genitor P₁, 10 plantas do genitor P₂ e 30 plantas da geração filial F₁ foram cultivadas em estufa, no departamento de pesquisa da empresa Sakata. A geração F₂ foi obtida pela autofecundação natural da geração F₁. O método para realizar os retrocruzamentos foi o mesmo descrito para a obtenção da geração híbrida F₁.

Aos 30 dias após a semeadura, as mudas de cada linhagem foram transplantadas para vasos individuais com capacidade para 12 L de substrato (Tropstrato V-6), distanciados no espaçamento de 1,2 m entre linhas e 0,5 m entre plantas. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com fertirrigação controlada. Para realizar a fertirrigação, foram utilizadas duas soluções estoques. Do transplante das mudas até o florescimento, no tanque A foram adicionados 600 g L⁻¹ de nitrato de cálcio, 200 g L⁻¹ de nitrato de potássio, 25 g L⁻¹ fertilizante

micro mineral (K₂O, S, Mg, B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) Rexolin® BRA e 15 g L⁻¹ de fertilizante mineral base de ferro (Yara® Ferro M-48). No tanque B, foram utilizados 200 g L⁻¹ de sulfato de potássio, 250 g L⁻¹ de Krista™ MKP e 350 g L⁻¹ de sulfato de magnésio. Do florescimento até o final do ciclo, a composição da solução concentrada do tanque A foi de 750 g L⁻¹ de nitrato de cálcio, 160 g L⁻¹ de nitrato de potássio, 150 g L⁻¹ de cloreto de potássio, 25 g L⁻¹ de fertilizante micro mineral (K₂O, S, Mg, B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) Rexolin® BRA e 15g L⁻¹ de fertilizante mineral base de ferro (Yara® Ferro M-48). No tanque B, foram adicionados 360 g L⁻¹ de sulfato de potássio, 180 g L⁻¹ de Krista™ MKP, 50 g L⁻¹ de fosfato de monoamônico, 450 g L⁻¹ magnésio. A fertirrigação foi realizada três vezes ao dia até a maturação dos frutos. A temperatura interna da casa de vegetação foi controlada através das cortinas laterais, sendo mantida em 25°C, em média. No estágio de maturação fisiológica, caracterizado por 100% de coloração vermelha dos frutos, foram retiradas as sementes dos frutos, manualmente, fermentadas por 48 horas, lavadas, secadas à temperatura ambiente e armazenadas em câmara fria.

As sementes dos genitores (P₁ e P₂), da geração filial F₁, da geração filiam F₂ e dos retrocruzamentos RC₁ e RC₂ foram levadas ao departamento de Fitopatologia da empresa Sakata, onde foram cultivadas para a obtenção de 30 plantas dos genitores e da geração F₁, 300 plantas da geração F₂ e 100 plantas dos retrocruzamentos, totalizando 590 plantas, as quais foram inoculadas com o ToMMV com o mesmo processo que o *screening* das 250 linhagens.

A avaliação da presença dos sintomas de mosaico ocorreu após 30 dias da inoculação, onde as plantas foram classificadas em resistentes (sem sintoma de mosaico) e susceptíveis (com sintoma de mosaico). Das plantas que não apresentaram sintomas, foram obtidos os extratos foliares e inoculados nas plantas diferenciadoras *Nicotiana tabacum* cv. Xanthii, para confirmar a ausência do vírus. Apenas as plantas que não multiplicaram o vírus foram classificadas como resistentes. Nesta última etapa a avaliação ocorreu 10 dias após a inoculação onde foi observado ou não sintomas de lesão necrótica local na planta diferenciadora.

3.2.1. Proposição e teste da hipótese do controle genético do caráter

A avaliação da segregação foi realizada para a geração F₂ e para os retrocruzamentos RC₁ e RC₂. Foi proposta a tabela de esperança fenotípica das plantas baseado em duas proposições. A primeira proposição é de um gene sob interação de dominância em que o fenótipo resistente ao ToMMV é homozigoto recessivo, como apresentado na Tabela 1. A segunda proposição trata do controle de dois genes com dois alelos de interação dominante e o

fenótipo resistente ao ToMMV aquele que é expresso por um par de genes homozigoto ou heterozigoto dominante e um par de genes homozigoto recessivos (Tabela 2).

Para confirmar a hipótese proposta foi realizado o teste de χ^2 a 5% de probabilidade conforme a expressão fenotípica esperada nas gerações RC₁ e F₂ conforme a Tabela 3 para um gene e a Tabela 4 para dois genes. No caso do resultado de nulidade do teste foi aceita a proposição como explicativa do controle do caráter.

Tabela 1 – Proposição de controle genético para a expressão do fenótipo de resposta ao ToMMV com um gene.

Gene A	Fenótipo
A_	Suscetível
aa	Resistente

A: alelo dominante

a: alelo recessivo

_ : loco variável

Tabela 2 – Proposição de controle genético para a expressão do fenótipo de resposta ao ToMMV com dois genes.

Gene A	Gene B	Fenótipo
A_	B_	Suscetível
A_	bb	Resistente
aa	B_	Suscetível
aa	bb	Suscetível

A: alelo dominante

a: alelo recessivo

_ : loco variável

Tabela 3 – Hipótese de proporções fenotípicas e genóticas das gerações das plantas de tomate para o caráter de resistência ao ToMMV com um gene.

Genitores	P ₁	X	P ₂
Fenótipo	S		R
Genótipo	100% AA		100% aa
Gametas	1/2 A		1/2 a
Primeira geração filial		F ₁	
Fenótipo		100% S	
Genótipo		Aa	
Gametas		1/2 A 1/2 a	
Autofecundação de F ₁	F ₁	X	F ₁
Segunda geração filial		F ₂	
Fenótipos		3/4 S: 1/4 R	
Genótipos		1/4 AA: 1/2 Aa: 1/4 aa	
Genitores	P ₁	X	F ₁
Retrocruzamento 1		RC ₁	
Fenótipo		100% S	
Genótipo		1/2 AA: 1/2 Aa	
Genitores	P ₂	X	F ₁
Retrocruzamento 2		RC ₂	
Fenótipo		1/2 R : 1/2 S	
Genótipo		1/4 Aa : 1/4 aa	

S: caráter suscetível ao ToMMV

R: caráter resistente ao ToMMV

Tabela 4 – Hipótese de proporções fenotípicas e genotípicas das gerações das plantas de tomate para o carácter de resistência ao ToMMV com dois genes.

Genitores	P ₁	X	P ₂
Fenótipo	S		R
Genótipo	100% AABB		100% aabb
Gametas	1/2 A : 1/2 B		1/2 a : 1/2 b
Primeira geração filial		F ₁	
Fenótipo		100% S	
Genótipo		AaBb	
Gametas		1/4 A : 1/4 a : 1/4 B : 1/4 b	
Autofecundação de F ₁	F ₁	X	F ₁
Segunda geração filial		F ₂	
Fenótipos		13/16 S : 3/16 R	
Genótipos		9/16 A_B_ : 3/16 A_bb : 3/16 aaB_ : 1/16 aabb	
Genitores	P ₁	X	F ₁
Retrocruzamento 1		RC ₁	
Fenótipo		100% S	
Genótipo		1/4 AABB : 1/4 AABb : 1/4 AaBB : 1/4 AaBb	
Genitores	P ₂	X	F ₁
Retrocruzamento 2		RC ₂	
Fenótipo		1/2 R : 1/2 S	
Genótipo		1/4 AABb : 1/4 AAbb : 1/4 AaBb : 1/4 Aabb	

S: carácter suscetível ao ToMMV

R: carácter resistente ao ToMMV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Busca por uma nova fonte de resistência ao ToMMV

Na primeira fase de *screening* foram avaliadas 4500 plantas divididas em 250 linhagens, que foram inoculadas com o ToMMV isolado, segundo o Apêndice, das quais 239 linhagens expressaram sintomas e foram excluídas das próximas fases do estudo. Na Figura 1 é possível observar a diferenciação entre as plantas. Nas 11 linhagens selecionadas não foram observadas plantas que expressaram o sintoma e passaram para a fase de confirmação da resistência através das plantas diferenciadoras.

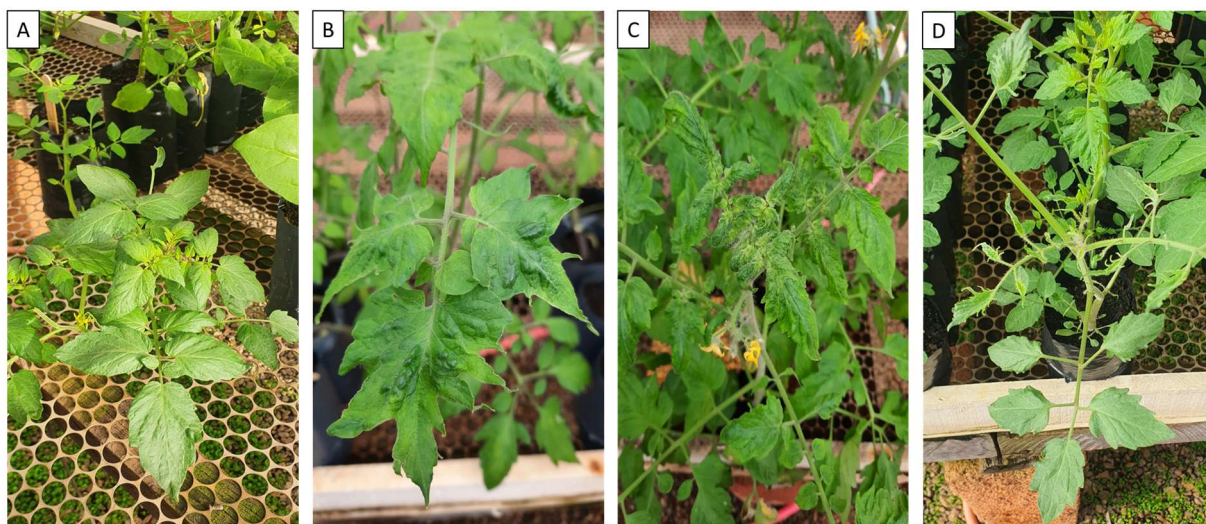


Figura 1 – Plantas de tomate inoculadas com o isolado de ToMMV que não expressaram (A) ou expressaram os sintomas da doença (B, C, D).

Não houve variância entre as plantas que apresentaram ou não os sintomas de ToMMV, o que sugere que a expressão fenotípica dos genes envolvendo a resistência tem pouca influência do ambiente e pode ser não específica por não ocasionar reação de hipersensibilidade (GALVEZ *et al.*, 2014). Esta é uma informação importante para a formulação da hipótese do presente trabalho, pois a depender da interação alélica do gene será realizada uma forma diferente de transferência da resistência durante o programa de melhoramento de plantas autógamas.

Ao obter o extrato das folhas das plantas das 11 linhagens selecionadas, observaram-se 7 linhagens que não transmitiram o vírus ao *N. tabacum* cv. Xanthii, diferenciação que pode ser observada na Figura 2. Estas plantas foram selecionadas para a próxima etapa do estudo (Tabela 5). Já as 4 demais linhagens transmitiram sintomas para as plantas diferenciadoras, indicando que havia a existência do vírus, mas sem a expressão de sintomas.



Figura 2 – Plantas de *N. tabacum* cv. Xanthii inoculadas com o extrato foliar das plantas de tomate que não expressaram (A) ou expressaram os sintomas de lesão local (B).

Tabela 5 – Número de plantas observadas de *N. tabacum* cv. Xanthii que expressaram ou não sintomas após a inoculação com os extratos foliares das linhagens não sintomáticas.

Linagem fonte do extrato	NPA ¹	NPS ²
11188	18	0
20441	18	0
20447	18	0
22834	18	0
37846	0	18
37881	0	18
37998	0	18
38011	18	0
38038	18	0
38053	0	18
38080	18	0

¹ Número de plantas assintomáticas.

² Número de plantas sintomáticas.

As 7 linhagens selecionadas passaram para a fase de marcador molecular quanto a presença dos genes Tm-1, Tm-2 e Tm-2². Nenhuma linhagem apresentou os genes Tm-1 ou Tm-2, enquanto seis linhagens apresentaram o gene Tm-2² e apenas o material genético 11188, a qual pertence a espécie selvagem de tomate *Solanum pennellii*, não apresentou algum dos genes (Tabela

6). Esta linhagem foi selecionada, pois é uma fonte de um novo gene de resistência, diferente dos demais conhecidos.

A persistência do vírus nos sistemas de cultivo devido sua alta capacidade de tolerância ao aumento de temperatura implica na demanda de híbridos resistentes, pois o cultivo de plantas suscetíveis aceleraria a multiplicação do vírus nos sistemas e seus danos econômicos seriam elevados, já que sua agressividade é maior que as dos demais *Tobamovirus* como o TMV e ToMV (TURINA; GERAATS; CIUFFO, 2016; NAGAI, 2017; NAGAI *et al.*, 2018; NAGAI *et al.*, 2019) e sua disseminação ocorre por sementes e para a identificação de sua presença são necessários testes de PCR (TURINA; GERAATS; CIUFFO, 2016). Como o Brasil importa sementes de países como o Chile, China, Tailândia e Índia (QUEZADO-DUVAL *et al.*, 2013), nos quais alguns deles já foram identificados a presença de ToMMV (LI *et al.*, 2014; BERTOMEU, 2021), há grande risco de disseminação deste vírus nos sistemas de cultivo de tomate, o que vai de encontro com a necessidade de novas fontes de resistência.

O reconhecimento desta nova fonte de resistência é relevante pois o único gene que expressa resistência ao ToMMV é o Tm-2². Em seus estudos, Nagai *et al.* (2019) observaram que, no Brasil, apenas o híbrido Alambra apresenta resistência parcial a tal vírus. Portanto, o material genético 11188 tem potencial para a transferência de resistência, já que o sistema de cultivo de tomate nacional carece de ferramentas de proteção contra o vírus.

Tabela 6 – Presença de genes de resistência identificados através de marcadores moleculares das linhagens resistentes ao ToMMV.

ID	Tm-1	Tm-2	Tm-2 ²
11188	Não	Não	Não
20441	Não	Não	Sim
20447	Não	Não	Sim
22834	Não	Não	Sim
38011	Não	Não	Sim
38038	Não	Não	Sim
38080	Não	Não	Sim

4.2. Controle genético do caráter do novo gene de resistência

A linhagem 8163, a qual é utilizada para a produção de híbridos comerciais e que é suscetível ao ToMMV, foi utilizada como parental receptor de pólen, enquanto o material genético 11188, selvagem e resistente ao ToMMV, foi utilizada como parental doador de pólen. Os fenótipos observados durante as gerações que compõem o teste de hipótese de proposição de

um gene de controle genético estão apresentados na Figura 3 e para dois genes de controle na Figura 4.

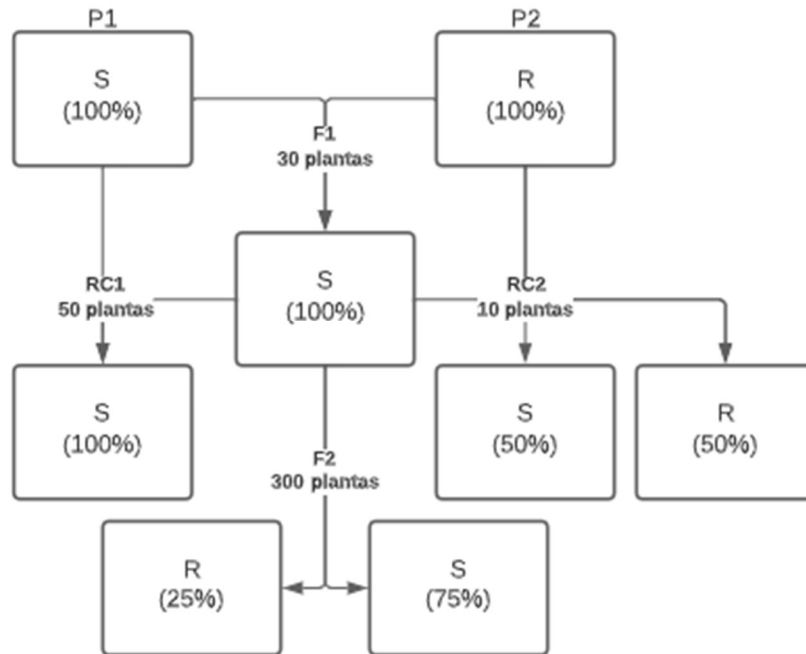


Figura 3 – Percentual de expressão fenotípica de resposta a inoculação de ToMMV e confirmação em plantas diferenciadoras para os caracteres de resistência (R) ou suscetibilidade (S) a doença com controle de um gene.

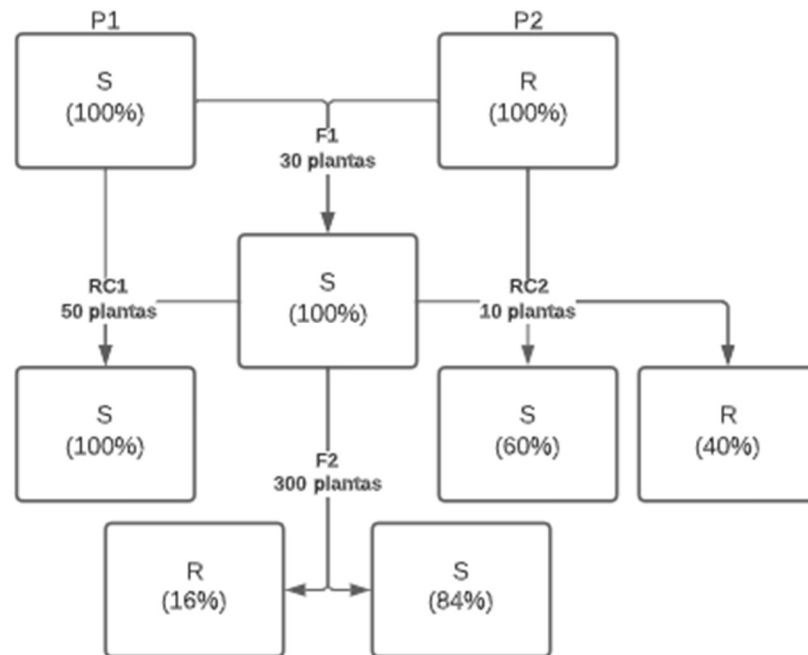


Figura 4 – Percentual de expressão fenotípica de resposta a inoculação de ToMMV e confirmação em plantas diferenciadoras para os caracteres de resistência (R) ou suscetibilidade (S) a doença com controle de dois genes.

No presente estudo, por se tratar de plantas de tomate, espécie diploide, os cromossomos são organizados em pares e segregados durante a meiose para a formação dos gametas (Tabela 2). Durante os diversos ciclos de autofecundação dos indivíduos, espera-se que as gerações parentais estejam em homozigose, ou seja, a constituição dos genes deve ser formada apenas por alelos idênticos. Quando cruzados dois indivíduos contrastantes em homozigose, o único resultado possível é o genótipo heterozigoto na geração F_1 , que expressa fenótipo suscetível tanto na proposição para um gene quanto para dois genes em função da interação alélica de dominância. As plantas desta primeira geração durante a meiose geram 50% dos gametas com alelo dominantes e 50% de gametas com alelo recessivos.

A geração filial F_2 irá apresentar diferenças dependendo da proposição, que para um gene irá gerar 75% de indivíduos suscetíveis enquanto para a proposição de controle com dois genes irá gerar 84% de indivíduos suscetíveis. Para o retrocruzamento com o parental suscetível (RC_1), a geração F_1 está em completa heterozigose para o gene em estudo enquanto o P_1 está em completa homozigose dominante. Neste caso, o cruzamento resultará em 50% de genótipos heterozigotos e 50% de genótipo dominantes para ambas as proposições, ou seja, todos os indivíduos devem ser suscetíveis.

O cruzamento da geração F₁ e o parental resistente P₂ irá resultar geração de retrocruzamento RC₂ com proporção fenotípica variável conforme a proposição, em que para um gene de controle do caráter haverá 50% dos indivíduos resistentes e 50% suscetíveis, enquanto para a proposição com dois genes será de 40% resistentes e 60% suscetíveis.

Ao realizar o teste de hipótese para as gerações F₂ e RC₂ apresentados na Tabela 3 e 4 para a proposição de controle do caráter por um ou dois genes, respectivamente, dispõe-se nas tabelas Tabela 7 e 8 os resultados. O valor estimado (χ^2_c) é maior que o valor tabelado ($\chi^2_{5\%} = 3,84$) com um grau de liberdade quando se trata de um gene sob interação alélica de dominância completa (Tabela 7), ou seja, $12,06 > 3,84$. Sendo assim recusa-se a hipótese de nulidade e considera-se que tal controle genético é improvável.

Para os resultados da proposição de controle do caráter através de dois genes em epistasia, em que o caráter é expresso pelo gene com alelo dominante heterozigoto ou homozigoto seguido de um gene de alelos recessivos em homozigose, o valor estimado foi menor que o valor tabelado, ou seja, $1,45 < 3,84$, permitindo considerar como plausível esta forma de controle da expressão do caráter de resistência ao ToMMV.

Por haver mais possibilidades de testes de número de genes, por exemplo, três genes, e outras possibilidades de interação não alélicas de epistasia (recessiva tripla, dominante tripla, recessiva x recessiva x dominante, recessiva x dominante x dominante, dominante x recessiva x recessiva, dominante x dominante x recessiva, dominante x recessiva x dominante e recessiva x dominante x recessiva) são justificáveis para propor que o futuro deste trabalho é aumentar o tamanho da população observada para avaliar outras proposições e, assim melhor orientar os programas de melhoramento de plantas. Também, é possível realizar o teste de χ^2 para a terceira geração (F₃), deixando o método de avaliação da proposição mais robusto.

Tabela 7 – Estimativa de χ^2 para testar a hipótese de distribuição fenotípica expressa por um gene após a inoculação de ToMMV.

Fenótipo	Proporção		Desvio		χ^2_c
	Observado (O)	Esperado (E)	(O-E)	(O-E) ² /E	
F ₂					
Suscetível	251	225	26	3,0044	12,06
Resistente	49	75	-26	9,0533	
RC ₂					
Suscetível	6	5	1	0,2	0,4
Resistente	4	5	-1	0,2	

Tabela 8 – Estimativa de χ^2 para testar a hipótese de distribuição fenotípica expressa por dois genes após a inoculação de ToMMV.

Fenótipo	Proporção		Desvio		χ^2_c
	Observado (O)	Esperado (E)	(O-E)	(O-E) ² /E	
F₂					
Suscetível	251	243,75	7,25	0,2156	1,15
Resistente	49	56,25	-7,25	0,9344	
RC₂					
Suscetível	6	5	1	0,2	0,4
Resistente	4	5	-1	0,2	

Além da avaliação da proposição de controle genético e da possibilidade de transferência dos genes, é importante avaliar o impacto da inserção da espécie selvagem nas características agronômicas das linhagens, pois nos testes realizados, o cruzamento interespecífico causou redução do tamanho e qualidade do fruto. Já para a multiplicação da linhagem, houve decréscimo do número de sementes por fruto na geração F₁, reduzindo a eficiência do programa de melhoramento de plantas nesta etapa.

O cruzamento interespecífico (*Solanum lycopersicum* x *Solanum pennellii*) também impossibilita a obtenção de um híbrido direto, ou seja, o cruzamento simples entre parentais para obtenção de geração F₁ pronta para a comercialização. Segundo os dados do presente estudo são necessários programas de retrocruzamento para a transferência da resistência ao ToMMV e é aplicável o teste de progênie para aumentar a eficiência do programa.

O gene identificado no presente trabalho carece de caracterização quanto a sua estrutura genômica e seu mecanismo de ação, informações estas consideradas úteis para entender o manejo ambiental para a expressão fenotípica do caráter e a possibilidade de quebra de resistência, assim como realizado por Weber *et al.* (2004) e Lanfermeijer, Warmink e Hille (2005) para os genes Tm-2 e Tm-2². Também, o conhecimento do gene permite o desenvolvimento de marcadores moleculares que seriam ferramentas fundamentais na aceleração da transferência do gene pela identificação precoce da sua presença nos programas de melhoramento de plantas (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

O caráter de resistência é possivelmente expresso por dominância homozigota ou heterozigota no primeiro gene, e homozigoze de alelos recessivos do segundo gene, o que resulta na vantagem de haver maior dificuldade de quebra de resistência quando da comercialização de um novo material, já que alelos recessivos tendem a resultar em maior dificuldade dos vírus em se

adaptarem aos mecanismos de ação não específicos (GALVEZ et al., 2014). Por outro lado, também aumenta a necessidade de incremento de retrocruzamentos sucessivos para a transferência da resistência para linhagens comerciais (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012; RAMALHO *et al.*, 2012).

Mesmo sob uma maior dificuldade de transferir o gene para híbridos comerciais, há grande importância na identificação deste gene, pois a dependência de apenas o gene Tm-2² (NAGAI *et al.*, 2019) para a resistência a ToMMV é um risco iminente de surgimento de novas estirpes que quebrem a resistência devido a exposição intensiva do gene em híbridos comerciais nos campos de produção. Caso um genótipo comercial seja lançado no mercado com tal gene, a pressão de seleção aumenta conforme as vendas da semente aumentam, logo este gene identificado no presente trabalho é uma solução para o manejo de resistência a esta doença tão agressiva.

5 CONCLUSÕES

Dentre 250 linhagens do banco de germoplasma da Sakata foi possível identificar uma linhagem selvagem (*Solanum pinnellii*) que expressa resistência ao ToMMV e que não possui o gene Tm-2², portanto sendo uma nova fonte de resistência. Para orientar os programas de melhoramento de plantas para transferência desta resistência, é plausível que o controle do fenótipo seja por dois genes com interação de epistasia, em que a expressão de resistência se dá por dominante heterozigoto ou homozigoto x homozigoto recessivo, porém, devido a existência de outras proposições não testadas, a continuidade deste trabalho é a ampliação dos testes para encontrar a proposição mais plausível.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Virgaviridae. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 98, n. 8, p. 1999–2000, 2017.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Lavras: UFV, 2007. p. 53-90.

ALTSCHUL, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

AMBRÓS, S. *et al.* Molecular and biological characterization of an isolate of Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) infecting tomato and other experimental hosts in eastern Spain. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 149, n. 2, p. 261–268, 2017.

BERTOMEU, M. M. **Detección de Tomato Mottle Mosaic virus en semilla comercial de tomate y pimiento**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universitat Politècnica de València. València, Espanha, p. 46, 2021.

BITENCOURT, G. A., *et al.* **Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2011. 22 p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974x; 29.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção agropecuária: tomate**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/br>>. Acesso em: 01 de jul. de 2022.

CHANDA, B. *et al.* Comparative Analysis of Host Range, Ability to Infect Tomato Cultivars with *Tm-2²* Gene, and Real-Time Reverse Transcription PCR Detection of Tomato Brown Rugose Fruit Virus. **Plant Disease**, [s. l.], v. 105, n. 11, p. 3643–3652, 2021.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2012, 508 p.

FAOSTATS. **Ranking**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity>. Acesso em: 01 de jul. de 2022.

- GALVEZ, L. C. *et al.* Engineered plant virus resistance. **Plant Science**, [s. l.], v. 228, p. 11–25, 2014.
- INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M. F. Capítulo 3: doenças causadas por vírus. In: LOPES, C. A (org.). **Doenças do tomateiro**. 3 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2021. 212 p.
- LANFERMEIJER, F. C.; WARMINK, J.; HILLE, J. The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-22 resistance genes from tomato differ in four amino acids. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 56, n. 421, p. 2925–2933, 2005.
- LI, R. *et al.* Complete Genome Sequence of a New Tobamovirus Naturally Infecting Tomatoes in Mexico. **Genome Announcements**, [s. l.], v. 1, n. 5, 2013.
- LI, Y. Y. *et al.* First Report of Tomato mottle mosaic virus Infection of Pepper in China. **Plant Disease**, [s. l.], v. 98, n. 10, p. 1447–1447, 2014.
- LOVELOCK, D. A. *et al.* Tomato mottle mosaic virus intercepted by Australian biosecurity in *Capsicum annuum* seed. **Australasian Plant Disease Notes**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 8, 2020.
- NAGAI, A. **Interação planta-patógeno: análises químicas em *Solanum pimpinellifolium* L. e *Solanum lycopersicum* “VFNT” infectadas pelo tomato mottle mosaic vírus**. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 223, 2017.
- NAGAI, A. *et al.* First Complete Genome Sequence of an Isolate of Tomato Mottle Mosaic Virus Infecting Plants of *Solanum lycopersicum* in South America. **Genome Announcements**, [s. l.], v. 6, n. 19, 2018.
- NAGAI, A. *et al.* Tomato mottle mosaic virus in Brazil and its relationship with Tm-2² gene. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 353–359, 2019a.
- QUEZADO-DUVAL, A. M. **Levantamento de doenças e mosca branca em tomateiro em regiões produtoras no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2013. 36p. Boletim Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Hortaliças, ISSN 1677-2229; 100.
- SUI, X. *et al.* Molecular and Biological Characterization of *Tomato mottle mosaic virus* and Development of RT-PCR Detection. **Plant Disease**, [s. l.], v. 101, n. 5, p. 704–711, 2017.
- TURINA, M.; GERAATS, B. P. J.; CIUFFO, M. First report of *Tomato mottle mosaic virus* in tomato crops in Israel. **New Disease Reports**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 1–1, 2016.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

WEBER, H. *et al.* The Tomato mosaic virus 30kDa movement protein interacts differentially with the resistance genes Tm-2 and Tm-22. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 149, n. 8, 2004.

WEBSTER, C. G. *et al.* First Report of Tomato mottle mosaic virus Infecting Tomato in the United States. **Plant Health Progress**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 151–152, 2014.

APÊNDICE

Número de plantas com sintomas de mosaico após inoculação com ToMMV.

ID ¹	NPA ²	NPS ³	ID	NPA	NPS	ID	NPA	NPS	ID	NPA	NPS	ID	NPA	NPS
11047	0	18	37885	0	18	37935	0	18	37985	0	18	38035	0	18
11188	18	0	37886	0	18	37936	0	18	37986	0	18	38036	0	18
20441	18	0	37887	0	18	37937	0	18	37987	0	18	38037	0	18
20447	18	0	37888	0	18	37938	0	18	37988	0	18	38038	18	0
22834	18	0	37889	0	18	37939	0	18	37989	0	18	38039	0	18
37840	0	18	37890	0	18	37940	0	18	37990	0	18	38040	0	18
37841	0	18	37891	0	18	37941	0	18	37991	0	18	38041	0	18
37842	0	18	37892	0	18	37942	0	18	37992	0	18	38042	0	18
37843	0	18	37893	0	18	37943	0	18	37993	0	18	38043	0	18
37844	0	18	37894	0	18	37944	0	18	37994	0	18	38044	0	18
37845	0	18	37895	0	18	37945	0	18	37995	0	18	38045	0	18
37846	18	0	37896	0	18	37946	0	18	37996	0	18	38046	0	18
37847	0	18	37897	0	18	37947	0	18	37997	0	18	38047	0	18
37848	0	18	37898	0	18	37948	0	18	37998	18	0	38048	0	18
37849	0	18	37899	0	18	37949	0	18	37999	0	18	38049	0	18
37850	0	18	37900	0	18	37950	0	18	38000	0	18	38050	0	18
37851	0	18	37901	0	18	37951	0	18	38001	0	18	38051	0	18
37852	0	18	37902	0	18	37952	0	18	38002	0	18	38052	0	18
37853	0	18	37903	0	18	37953	0	18	38003	0	18	38053	18	0
37854	0	18	37904	0	18	37954	0	18	38004	0	18	38054	0	18
37855	0	18	37905	0	18	37955	0	18	38005	0	18	38055	0	18
37856	0	18	37906	0	18	37956	0	18	38006	0	18	38056	0	18
37857	0	18	37907	0	18	37957	0	18	38007	0	18	38057	0	18
37858	0	18	37908	0	18	37958	0	18	38008	0	18	38058	0	18
37859	0	18	37909	0	18	37959	0	18	38009	0	18	38059	0	18
37860	0	18	37910	0	18	37960	0	18	38010	0	18	38060	0	18
37861	0	18	37911	0	18	37961	0	18	38011	18	0	38061	0	18
37862	0	18	37912	0	18	37962	0	18	38012	0	18	38062	0	18
37863	0	18	37913	0	18	37963	0	18	38013	0	18	38063	0	18
37864	0	18	37914	0	18	37964	0	18	38014	0	18	38064	0	18
37865	0	18	37915	0	18	37965	0	18	38015	0	18	38065	0	18
37866	0	18	37916	0	18	37966	0	18	38016	0	18	38066	0	18
37867	0	18	37917	0	18	37967	0	18	38017	0	18	38067	0	18
37868	0	18	37918	0	18	37968	0	18	38018	0	18	38068	0	18
37869	0	18	37919	0	18	37969	0	18	38019	0	18	38069	0	18
37870	0	18	37920	0	18	37970	0	18	38020	0	18	38070	0	18
37871	0	18	37921	0	18	37971	0	18	38021	0	18	38071	0	18
37872	0	18	37922	0	18	37972	0	18	38022	0	18	38072	0	18
37873	0	18	37923	0	18	37973	0	18	38023	0	18	38073	0	18
37874	0	18	37924	0	18	37974	0	18	38024	0	18	38074	0	18
37875	0	18	37925	0	18	37975	0	18	38025	0	18	38075	0	18
37876	0	18	37926	0	18	37976	0	18	38026	0	18	38076	0	18
37877	0	18	37927	0	18	37977	0	18	38027	0	18	38077	0	18
37878	0	18	37928	0	18	37978	0	18	38028	0	18	38078	0	18
37879	0	18	37929	0	18	37979	0	18	38029	0	18	38079	0	18
37880	0	18	37930	0	18	37980	0	18	38030	0	18	38080	18	0
37881	18	0	37931	0	18	37981	0	18	38031	0	18	38081	0	18
37882	0	18	37932	0	18	37982	0	18	38032	0	18	38082	0	18
37883	0	18	37933	0	18	37983	0	18	38033	0	18	38083	0	18
37884	0	18	37934	0	18	37984	0	18	38034	0	18	38084	0	18

¹ Identificação da linhagem.

² Número de plantas assintomáticas.

³ Número de plantas sintomáticas.