



**UnB**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**EXPRESSÃO FENOTÍPICA E MECANISMOS DE AÇÃO DE GENES  
ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AMPLA A BEGOMOVÍRUS  
MONOPARTIDOS E BIPARTIDOS EM TOMATE**

**Rita de Cássia Pereira Carvalho**

**Brasília - 2009**

**Conselho Superior de Investigações Científicas**



Estação Experimental La Mayora  
29750- Algarrobo Costa (Málaga)  
Espanha  
<http://www.eelm.csic.es>

**Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças**



Embrapa Hortaliças CNPH  
218-70359-970 Brasília-DF  
Brasil  
<http://www.cnph.embrapa.br>

Dr. Renato de Oliveira Resende, engenheiro agrônomo e professor/pesquisador dos Departamentos de Biologia Celular e Fitopatologia da Universidade de Brasília, Dr. Leonardo Silva Boiteux pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças) e professor do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília e Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca pesquisadora do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças),

**Certificam**

Que a presente tese de título ‘Expressão Fenotípica e Mecanismos de Ação de Genes Envolvidos na Resistência Ampla a Begomovírus Monopartidos e Bipartidos em Tomate’ foi realizada nos laboratórios de Melhoramento da Embrapa Hortaliças e na Estação Experimental La Mayora, e considerando que constitui um trabalho de Tese de Doutorado autorizam sua apresentação no Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília.

Brasília - Abril de 2009

---

Leonardo Silva Boiteux

---

Maria Esther de Noronha Fonseca

---

Renato de Oliveira Resende

**RITA DE CÁSSIA PEREIRA CARVALHO**

**EXPRESSÃO FENOTÍPICA E MECANISMOS DE AÇÃO DE GENES  
ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AMPLA A BEGOMOVÍRUS  
MONOPARTIDOS E BIPARTIDOS EM TOMATE**

Tese apresentada à Universidade de  
Brasília como parte das exigências  
do Programa de Pós-Graduação e  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de Doutor

BRASÍLIA  
Abril-2009

**Expressão Fenotípica e Mecanismos de Ação de Genes Envolvidos na Resistência Ampla a Begomovírus Monopartidos e Bipartidos em Tomate**

Trabalho realizado junto ao programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do professor Dr. Renato de Oliveira Resende e co-orientação do Dr. Leonardo Silva Boiteux e Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca da Embrapa Hortaliças, e apoio institucional e financeiro da CAPES e CNPq.

**Aprovado por:**

---

**Renato de Oliveira Resende (orientador)**

Professor - Departamento de Fitopatologia e Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília

---

**Alice Kazuko Inoue Nagata**

Pesquisadora - Embrapa Hortaliças (CNPH)

---

**Francisco Murilo Zerbini Júnior**

Professor - Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa

---

**Josias Corrêa de Faria**

Pesquisador - Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP)

---

**Mirtes Freitas Lima**

Pesquisadora - Embrapa Hortaliças (CNPH)

*Reginaldo e Thiago*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

...Um trabalho desta natureza não poderia ser realizado sem a colaboração e apoio de diversas pessoas e instituições que em diferentes momentos ajudaram e se revelaram fundamentais para sua execução, as quais eu gostaria de dar os sinceros agradecimentos...

À Universidade de Brasília, especialmente ao Departamento de Fitopatologia, agradeço não só a formação acadêmica, mas também a oportunidade e todo apoio para realização do doutorado.

Quero agradecer de modo especial ao meu orientador Renato, por sua atenção, apoio, otimismo, confiança e amizade. Obrigada também pelos valiosos ensinamentos e por, juntamente com Enrique Moriones propiciarem-me a oportunidade ímpar de crescimento acadêmico e pessoal. Obrigada por esta oportunidade de aprender e contribuir com a Ciência.

A CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo.

À Embrapa-CNPq, especialmente aos meus co-orientadores Maria Esther e Leonardo Boiteux pelo espaço e infra-estrutura oferecidos. Agradeço-lhes também pela amizade, empolgação, incentivo, orientação e sugestões apresentadas, importantes contribuições para este trabalho.

Agradeço a Alice Nagata pela disponibilização de espaço físico quando precisei e pelas valiosas sugestões, atenção e partilha do saber.

Aos membros da banca examinadora, Alice Kazuko Inoue Nagata, Francisco Murilo Zerbini Júnior, Josias Corrêa de Faria e Mirtes Freitas Lima por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Aos professores do curso que contribuíram para minha formação profissional: Adalberto Café Filho, Carlos Antonio Inácio, Carlos Hidemi Uesugui, Cláudia Renata Martins *in memoria*, Cláudio Lúcio Costa, Denise Vilela Rezende Santiago, José Carmine Dianese, Juvenil Enrique Cares, Luiz Eduardo Bassay Blum, Marisa Álvares Ferreira, Mariza Sanchez e Renato Resende de Oliveira. A vocês que dedicaram seu tempo e sua experiência, o meu muito obrigado e eterno reconhecimento.

Em especial, quero agradecer ao professor Dianese, pelo apoio, incentivo e por ensinar-me tanto de Ciência. Acima de tudo, obrigada por ser exemplo de dedicação e acompanhar-me nesta jornada, aguçando em mim o sentido crítico com o qual se deve fazer ciência, estimulando o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

Aos secretários do programa da Pós-Graduação, Ribamar e Silene, sempre tão prestativos.

Aos pesquisadores da Embrapa-CNPq, sempre muito atenciosos e em especial Aílton, Alice Quezado, Carlos Lopes, Charchar, Sabrina, João Bosco e Warley.

A todos os amigos do doutorado, cujos caminhos se cruzaram diante de um ideal comum, sempre soubemos conviver e nos respeitar, estreitando a cada dia os nossos laços de

amizade. Obrigada especialmente aos eternos amigos Ângela, Ednalva (Edy), Érico e Milton, obrigado pelo apoio, convívio, companheirismo e amizade.

Obrigada também aos amigos que passaram pelo laboratório de melhoramento Elaine, Janaína, Juliana, Maria do Desterro, Naya, Patrícia Pereira, Patrícia Gomes, Éder; amigos do laboratório de Virologia e Fitopatologia da Embrapa Leonardo Albuquerque, Mariana Martins, Mariana Halwass, Sarah, Pedro Paulo, Edmércia, Paulinho, Carol, Thaís, Leonardo e Helena.

À minha grande amiga Ednalva, por sempre somar entusiasmos e alegrias, e é claro, pelo apoio e amizade sincera.

As novas amizades conquistadas Mariana Halwass, Patrícia Pereira, Patrícia Gomes e Sarah, pela amizade sólida e verdadeira. Muito Obrigada!

Obrigada aos amigos Francisco (Chico Bucha), Emanuel, Francisco (Chiquinho), Régis e Oneilson pela ajuda, amizade e bom humor constantes. Agradeço também a William e Lúcio por serem tão prestativos e dedicados.

De igual forma, estou grata a todos os que colaboraram no processo de coleta de dados, a tão prestativa e eficiente 'equipe do tomate' da Embrapa-CNPH pelo extraordinário trabalho que realizam e por terem me acompanhado em uns tantos ensaios. Régis, Claudemir (Toquinho), Ronan, Ronaldinho, Sebastião, Pamela e Ary, os meus sinceros agradecimentos.

A grande família que é La-Mayora, pela calorosa acolhida durante toda a estadia na Espanha e pelo privilégio de ter participado de uma equipe de virologia tão bem estruturada e produtiva.

Obrigada Enrique Moriones pela acolhida, amizade, orientação e exemplo, não só de dedicação, mas de determinação e competência.

Obrigada Fali por ser exemplo de sabedoria, pelos ensinamentos sobre o mundo do melhoramento vegetal, análises estatísticas e valiosas reflexões que contribuíram não só para o trabalho, mas para minha formação acadêmica.

Obrigada Jesus-Navas, pela amizade, conselhos e por ensinar e me levar a conhecer tanto da cultura andaluza e africana!

Ao grupo de Virologia de La-Mayora Anelise, Belén, Carmen, Diego, Elena, Gloria, Juan, Helenita, Isa, Patrícia, Rocio, Reme, Maria Victoria e Kelly. A todos de Micologia, Fruticultura e Melhoramento: Davínia, Lourdes, Mariola, Afif, Rosa, Gaby, Luiz, Paola, Jorge, Librada, Carol, Francisco, Fernando, Emilio, Lídia, Maria José, Rocio, Carmen Ruiz, Pilar, Xavi, Juanma, Tony, Eli, enfim, muito obrigada a todos pela alegria, amizade e bom convívio.

A David, Jeronimo, Juan Cardenas, Antonio Cordon, Carmen e Carmelita, obrigada por serem sempre tão cordiais e prestativos. Agradeço também a Manolo, Antônio Navas e Abel por tantas idas e voltas!

As queridas amigas Carmen, Mariola, Manhsoore, Anelise e Kelly por compartilharmos juntas de tantos momentos, conhecermos lugares, pessoas e tanta cultura! Obrigada por tantos momentos de alegria e sincera amizade. Sentirei muito a falta de vocês!

Agradeço também as amigas Lalitha, Mariela, Marta, Maria Jose, Rocio Camero, Rocio e Mike. Aos amigos Carlos, Emílio, Xavi e Fernando. Vocês são muito especiais. Obrigada pela amizade e confiança.

Tenho muito que agradecer a Severiano, Miguel Ángel, Gonzalo, Luiz, Rocio Camero, Paco Sánchez, Rafael Gil, Rafael Gómez e todo o grupo, sempre tão atenciosos, competentes e prestativos, e que, tanto contribuíram para a realização dos ensaios.

E por fim uma palavra de apreço aos meus familiares Drika, Aline, tias Marta e Aparecida, tio João e especialmente a minha irmã Rosane, irmãos, cunhadas (os), sobrinhos (as) pela compreensão, alegria e atenção sem reservas.

Ao meu pai Álvaro e as minhas duas mães, Maria Aparecida e Maria Barbosa. Ao meu esposo Reginaldo e ao meu filho Thiago. Obrigada pelo amor, incentivo e em reconhecimento por tudo.



## ÍNDICE GERAL

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | 1  |
| <b>CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica</b> .....   | 5  |
| 1. Origem, taxonomia, importância e patógenos da cultura.....   | 5  |
| 2. Família <i>Geminiviridae</i> – Gênero <i>Begomovirus</i> monopartido e bipartido<br>organização genômica e expressão de proteínas.....   | 7  |
| 2.1. Família <i>Geminiviridae</i> - Gênero <i>Begomovirus</i> monopartido e bipartido.....  | 7  |
| 2.2. Organização genômica e expressão de proteínas.....   | 12 |
| 3. <i>Bemisia tabaci</i> : características, hospedeiras, biótipos, transmissão de<br>begomovírus, aspectos epidemiológicos e manejo de ‘begomovirose’.....  | 14 |
| 3.1. <i>Bemisia tabaci</i> : características, hospedeiras, biótipos e transmissão de<br>begomovírus.....  | 15 |
| 3.2. Aspectos epidemiológicos e manejo de ‘begomovirose’.....   | 19 |
| 4. Genes de resistência a doenças.....  | 22 |
| 5. Nematóides: o gênero <i>Meloidogyne</i> ; resistência: gene <i>Mi</i> .....  | 27 |
| 5.1. Nematóides: o gênero <i>Meloidogyne</i> .....  | 27 |
| 5.2. Resistência: gene <i>Mi</i> .....  | 29 |
| 6. Marcadores Moleculares, marcadores baseados em análises de restrição de DNA<br>e marcadores baseados na amplificação de DNA.....   | 30 |
| 6.1. Marcadores Moleculares.....  | 30 |
| 6.2. Marcadores baseados em análises de restrição de DNA.....   | 32 |
| 6.2.1. RFLP (‘Restriction Fragment Length Polymorphism’)......  | 32 |
| 6.3. Marcadores baseados na amplificação de DNA.....  | 33 |
| 6.3.1. Microssatélites (‘Simple Sequence Repeats’)......  | 33 |
| 6.3.2. AFLP (‘Amplified Fragment Length Polymorphism’)......  | 34 |
| 6.3.3. RAPD (‘Random Amplified Polymorphic DNA’)......  | 34 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | 36 |
| <b>CAPÍTULO 2 - Impacto da época de inoculação de <i>Tomato severe rugose virus</i><br/>(ToSRV) e do gene de resistência <i>Ty-1</i> em componentes de produção e qualidade<br/>de híbridos de tomate para processamento industrial</b> ..... | 37 |
| <b>RESUMO</b> .....   | 38 |

|   |            |
|---|------------|
| ABSTRACT.....   | 39         |
| INTRODUÇÃO.....   | 40         |
| MATERIAL E MÉTODOS.....   | 43         |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 46         |
| <b>CAPÍTULO 3 - Fontes de resistência em <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i>) a espécies de <i>Meloidogyne</i> e <i>Begomovirus</i> monopartido e bipartido.....</b>   | <b>61</b>  |
| RESUMO.....   | 62         |
| ABSTRACT.....   | 63         |
| INTRODUÇÃO.....   | 63         |
| MATERIAL E MÉTODOS.....   | 66         |
| RESULTADOS.....   | 69         |
| DISCUSSÃO.....  | 71         |
| <b>CAPÍTULO 4 - Níveis de resistência de acessos <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i>) a <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B e efeitos na eficiência de transmissão de espécies de <i>Begomovirus</i> de genoma bipartido.....</b>                    | <b>80</b>  |
| RESUMO.....   | 81         |
| ABSTRACT.....   | 82         |
| INTRODUÇÃO.....   | 84         |
| MATERIAL E MÉTODOS.....   | 86         |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 88         |
| <b>CAPÍTULO 5 - Mecanismos associados com a resistência de ‘TX-468-RG’ derivada de ‘Tyking’ ao <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>-Israel (TYLCV-IL) e seus efeitos na dispersão primária e secundária do vírus via <i>Bemisia tabaci</i> biótipo Q...</b> | <b>97</b>  |
| RESUMO.....   | 98         |
| ABSTRACT.....   | 99         |
| INTRODUÇÃO.....   | 100        |
| MATERIAL E MÉTODOS.....   | 103        |
| RESULTADOS.....   | 107        |
| DISCUSSÃO.....  | 108        |
| <b>CAPÍTULO 6 - Análise do padrão de segregação da resistência de famílias F<sub>2:3</sub> derivadas de ‘Tyking’ frente à espécie de begomovírus monopartido <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>-Israel (TYLCV-IL).....</b>                                | <b>116</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>117</b> |
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>118</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>120</b> |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>122</b> |
| <b>CAPÍTULO 7 - Identificação de marcadores RAPD ('Randomly Amplified Polymorphic DNA') associados com a resistência de 'TX-468-RG' (gene <i>tcm-1</i>) ao begomovírus bipartido <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMoV).....</b> | <b>129</b> |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>130</b> |
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>134</b> |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>135</b> |
| <b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>   | <b>144</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>147</b> |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Tabela 1</b> - Relação de espécies do gênero <i>Solanum</i> equivalentes às espécies do antigo gênero <i>Lycopersicum</i> (extraído de Peralta <i>et al.</i> , 2005).....  | 7         |
| <b>Tabela 2</b> - Funções conhecidas de proteínas codificadas por espécies de <i>Begomovirus</i> .....  | 14        |
| <b>Tabela 3</b> - Genes de resistência a insetos e patógenos (vírus, bactérias, nematóides e fungos) provenientes de diferentes fontes selvagens de <i>Solanum</i> (adaptada de Foolad, 2007).....  | 25        |
| <b>Tabela 4</b> - Fontes de resistência aos begomovírus do ‘complexo viral TYLCV’, seguindo a antiga nomenclatura do gênero (modificado de Marín, 2004).....  | 26        |
| <b>CAPÍTULO 2 - Impacto da época de inoculação de <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) e do gene de resistência <i>Ty-1</i> em componentes de produção e qualidade de híbridos de tomate para processamento industrial.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>Tabela 1</b> - Efeito da época de exposição ao <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) na intensidade de sintomas em acessos de tomate com e sem o gene <i>Ty-1</i> de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias, (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa de vegetação, transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas a inoculação natural em campo.....  | 54        |
| <b>Tabela 2</b> - Efeito da infecção viral e de diferentes épocas de exposição ao <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) em componentes de produção e qualidade de frutos de acessos de tomate para processamento, com e sem o gene <i>Ty-1</i> de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa de vegetação, transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas a inoculação natural em campo.....                     | 55        |
| <b>Tabela 3</b> - Efeito da infecção viral e de diferentes épocas de exposição ao <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) em componentes de produção envolvendo o número de frutos produzidos por acessos de tomate para processamento, com e sem o gene <i>Ty-1</i> de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa de vegetação, transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas a inoculação natural em campo..... | 56        |
| <b>Tabela 4</b> - Efeito da infecção viral e de diferentes épocas de exposição ao   |           |

|  |    |
|--|----|
| <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) em componentes de produção de acessos de tomate para processamento, com e sem o gene <i>Ty-1</i> de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa de vegetação e transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas a inoculação natural em campo.....   | 57 |
| <b>Tabela 5</b> - Efeito da infecção viral e de diferentes épocas de exposição ao <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) em componentes de qualidade de acessos de tomate para processamento, com e sem o gene <i>Ty-1</i> de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias, (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa de vegetação e transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas a inoculação natural em campo..... | 58 |
| <b>CAPÍTULO 3 - Fontes de resistência em <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i>) a espécies de <i>Meloidogyne</i> e <i>Begomovirus</i> monopartido e bipartido.....</b>  | 61 |
| <b>Tabela 1</b> - Avaliação da reação de <i>Solanum</i> spp. ao begomovírus bipartido <i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV) e uma população mista de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Meloidogyne javanica</i> .....  | 76 |
| <b>Tabela 2</b> - Grupo de <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i> ) identificados com resistência simultânea a <i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV) e a uma população mista de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i> .....  | 78 |
| <b>Tabela 3</b> - Avaliação de acessos de <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i> ) frente ao <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -Mild (TYLCV-Mld) e <i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i> -Spain (TYLCSV-ES) após inoculação via <i>Agrobacterium</i> e <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -Israel (TYLCV-IL) por inoculação via <i>Agrobacterium</i> e infecção natural por <i>Bemisia tabaci</i> . Avaliação conduzida aos 30 dias após inoculação.....                    | 79 |
| <b>CAPÍTULO 4 - Níveis de resistência de acessos de <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i>) a <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B e efeitos na eficiência de transmissão de espécies de <i>Begomovirus</i> de genoma bipartido.....</b>  | 80 |
| <b>Tabela 1</b> - Reação de <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i> ) quanto à colonização por uma população de mosca-branca ( <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B) avirulífera.....  | 94 |
| <b>Tabela 2</b> - Avaliação de resistência de <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i> ) à infecção por <i>Tomato mottle leaf curl virus</i> (ToMoLCV).....  | 94 |
| <b>Tabela 3</b> - Avaliação de resistência de <i>Solanum</i> spp. (seção <i>Lycopersicon</i> ) à infecção por um isolado de begomovírus bipartido via moscas-brancas   | 95 |

virulíferas.....

**CAPÍTULO 6 - Análise do padrão de segregação da resistência de famílias F<sub>2:3</sub> derivadas de ‘Tyking’ frente à espécie de begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL).....** 116

**Tabela 1** - Distribuição e fenotipagem de famílias F<sub>2:3</sub> resistentes, suscetíveis e segregantes provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* ‘Ohio 8245’ (suscetível) x ‘TX-468-RG’ (resistente) frente ao begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus*- Israel (TYLCV-IL)..... 128

**CAPÍTULO 7 - Identificação de marcadores RAPD (‘Randomly Amplified Polymorphic DNA’) associados com a resistência de ‘TX-468-RG’ (gene *tcm-1*) ao begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV).....** 129

**Tabela 1** - Distribuição e fenotipagem de indivíduos F<sub>2</sub>, provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* ‘Ohio 8245’ (suscetível a begomovírus) x ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus, devido ao gene *tcm-1*) com base em índice de severidade para infecção por begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus*, ToCMoV..... 140

**Tabela 2** - Frequência de associação de marcadores a fenótipos de resistência ou suscetibilidade de 149 indivíduos F<sub>2</sub> provenientes de um cruzamento entre *Solanum lycopersicum* ‘Ohio 8245’(suscetível a begomovírus) x ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus, gene *tcm-1*) ..... 141

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica</b>  | 5  |
| <b>Figura 1</b> - Representação esquemática da organização genômica de begomovírus bipartidos e monopartidos. As setas indicam a posição dos genes e a direção em que ocorre a transcrição. Nomes e proteínas codificadas por estes genes encontram-se na Tabela 2. AV2: Presente em begomovírus originários da Europa, Ásia e África.....   | 13 |
| <b>Figura 2</b> - Adulto de <i>Bemisia tabaci</i> alimentando-se em folha de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....   | 16 |
| <b>CAPÍTULO 2 - Impacto da época de inoculação de <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) e do gene de resistência <i>Ty-1</i> em componentes de produção e qualidade de híbridos de tomate para processamento industrial.....</b>   | 37 |
| <b>Figura 1</b> - Análise global do efeito da infecção por <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) em três componentes (variáveis) de produção de sete acessos de tomateiro inoculados (I) e não-inoculados (NI) em diferentes idades (épocas) após a semeadura. NFV = Número de frutos verdes por planta; NFM = Número de frutos maduros por planta e NTF = Número total de frutos por planta. As diferenças entre os grupos NI e I foram significativas (Tukey 5%) para todos os três componentes avaliados.....   | 59 |
| <b>Figura 2</b> - Análise global do efeito da infecção por <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) em quatro componentes (variáveis) de produção de sete acessos de tomateiro inoculados (I) e não-inoculados (NI) em diferentes idades (épocas) após a semeadura. PFV = Peso de frutos verdes por planta; PFM = Peso de frutos maduros por planta; PTF = Peso total de frutos por planta e PFP = Peso fresco de planta. As diferenças entre os grupos NI e I foram significativas (Tukey 5%) para todos os quatro componentes avaliados.....  | 59 |
| <b>Figura 3</b> - Análise global do efeito da infecção por <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) na produtividade (t/ha) de sete acessos de tomateiro inoculados (I) e não-inoculados (NI) em diferentes idades (épocas) após a semeadura. O híbrido 'HEI-036' possui o 'locus' de resistência <i>Ty-1</i> em heterozigose. Os demais híbridos não possuem genes de resistência ao ToSRV. Valores (de produtividade) seguidos pela mesma letra (dentro de cada grupo NI ou I) não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade e encontram-se representados acima das barras ..... | 60 |
| <b>CAPÍTULO 3 - Fontes de resistência em <i>Solanum</i> (seção <i>Lycopersicon</i>) a espécies de <i>Meloidogyne</i> e <i>Begomovirus</i> monopartido e bipartido</b>  | 61 |
| <b>Figura 1</b> - Reação de acessos de diferentes espécies de <i>Solanum</i> (seção  |    |

|  |     |
|--|-----|
| <p><i>Lycopersicon</i>) a <i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV), <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i>. Controles e acessos foram inoculados com 6.000 ovos e juvenis em condição de casa de vegetação e inoculados, via mosca-branca com ToRMV e foram posteriormente transplantados para campo naturalmente infestado com <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> e com presença de mosca-branca. <b>Fig. 1A-1B</b> - <i>S. lycopersicum</i> ‘TX-468-RG’ (resistente a ToRMV e suscetível a <i>Meloidogyne</i> spp.); <b>Fig. 1C-1D</b> - <i>S. lycopersicum</i> ‘Viradoro’ (suscetível a ToRMV e resistente a <i>Meloidogyne</i> spp.); <b>Fig. 1E-1F</b>- <i>S. peruvianum</i> ‘CNPH 0101’ com resistência simultânea a ToRMV e <i>Meloidogyne</i> spp.....</p>                                   | 75  |
| <p><b>CAPÍTULO 4 - Níveis de resistência de acessos de <i>Solanum</i> (seção <i>Lycopersicon</i>) a <i>Bemisia tabaci</i> biótipo B e efeitos na eficiência de transmissão de espécies de <i>Begomovirus</i> de genoma bipartido.....</b></p>  | 80  |
| <p><b>Figura 1</b> - Detecção de begomovírus em amostras foliares dos acessos ‘CNPH 409’, ‘CNPH 421’, ‘CNPH 1678’, ‘CNPH 410’, ‘CNPH 423’, ‘CNPH 416’ e do controle suscetível ‘Viradoro’. Amostras foram coletadas aos 45 dias após semeio em plantas expostas à inoculação contínua de uma espécie de begomovírus bipartido por <i>Bemisia tabaci</i>. As amostras foram imobilizadas diretamente (duas repetições por planta) em membrana de náilon N+ (Nylon<sup>+</sup>, Roche Diagnostics). Foi utilizada uma sonda para o DNA-A, marcada com digoxigenina e revelada por quimioluminescência. Os controles usados como negativo e positivo foram plantas de tomate sadio e plantas da cultivar ‘Viradoro’ infectadas. Os números à esquerda indicam o código da planta amostrada dentro de cada acesso.....</p> | 96  |
| <p><b>CAPÍTULO 5 - Mecanismos associados com a resistência de ‘TX-468-RG’ derivada de ‘Tyking’ ao <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>-Israel (TYLCV-IL) e seus efeitos na dispersão primária e secundária do vírus via <i>Bemisia tabaci</i> biótipo Q.....</b></p>   | 97  |
| <p><b>Figura 1</b> - Desenho experimental utilizado e esquema da disposição de plantas nos ensaios de dispersão secundária utilizando o acesso de tomate suscetível ‘Moneymaker’ (MM) e acesso resistente ‘TX-468-RG’. Plantas de ‘Moneymaker’ (MM) ao centro funcionando como fontes de inóculo para plantas de ‘Moneymaker’ (MM) (A) ou plantas de ‘TX-468-RG’ (B) e Plantas de ‘TX-468-RG’ como fontes de inóculo para plantas de ‘Moneymaker’ (C) (MM) ou plantas de ‘TX-468-RG’ (D).....</p>  | 112 |
| <p><b>Figura 2</b> - Plantas de ‘Moneymaker’ (A) e de ‘TX-468-RG’ (B) inoculadas com TYLCV-IL (C) Detecção de TYLCV-IL em plantas de ‘Moneymaker’ (cultivar suscetível) e ‘TX-468-RG’(resistente) com base em hibridização molecular de pecíolos de folha apical aos 24 dias após inoculação (DAI).....</p>  | 112 |
| <p><b>Figura 3</b> - Hibridização com sonda para 18S rRNA (A) ou para TYLCV-IL (B) de diluições seriadas de extratos de ácidos nucleicos totais obtidos a partir de folhas apicais de plantas analisadas aos 24 dai.....</p>   | 113 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 4</b> - Detecção de TYLCV-IL por hibridização molecular de pecíolos de folhas apicais de plantas de ‘Moneymaker’ e ‘TX-468-RG’ enxertadas sobre porta-enxertos infectados (28 dias após enxertia). X = Enxertos perdidos.....   | 113 |
| <b>Figura 5</b> - Porcentagem de plantas infectadas em ‘Moneymaker’ e ‘TX-468-RG’ aos 7, 10, 14, 21 e 28 dias após tratamento das moscas-brancas virulíferas em ensaios de dispersão primária.....  | 114 |
| <b>Figura 6</b> - Incidência de plantas infectadas com TYLCV-IL em ‘Moneymaker’ e ‘TX-468-RG’ aos 7, 14, 21 e 28 dias após tratamento das moscas-brancas não-virulíferas em ensaios de dispersão secundária.....  | 115 |
| <b>CAPÍTULO 6 - Análise do padrão de segregação da resistência de famílias F<sub>2:3</sub> derivadas de ‘Tyking’ frente à espécie de begomovírus monopartido <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>-Israel .....</b>  | 116 |
| <b>Figura 1</b> - População segregante de famílias F <sub>2:3</sub> derivadas do cruzamento ‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’ utilizadas na avaliação para padrões de segregação da resistência a begomovírus <b>A</b> - Plantas em estágio de 3-4 folhas antes da inoculação e <b>B</b> - Inoculação de um clone infectivo de <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -Israel (TYLCV-IL) mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>  | 124 |
| <b>Figura 2</b> - Expressão fenotípica de genótipos de tomate frente à inoculação com um clone infectivo de <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> - Israel (TYLCV-IL) via agroinoculação. Da parte superior para a inferior: ‘Moneymaker’ - controle positivo ( <b>A</b> - inoculado e <b>B</b> - não inoculado); ‘Ohio 8245’-parental suscetível ( <b>C</b> - inoculado e <b>D</b> - não inoculado); ‘TX-468-RG’- parental resistente ( <b>E</b> - inoculado e <b>F</b> - não inoculado) e população F1 (derivado do cruzamento ‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’) ( <b>G</b> - inoculado e <b>H</b> - não inoculado).....  | 125 |
| <b>Figura 3</b> - Acumulação viral em tecidos de plantas de tomate inoculadas com um clone infectivo de <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> - Israel (TYLCV-IL) via agroinoculação e detecção via hibridização com sonda molecular específica marcada com digoxigenina. Painel superior corresponde às plantas inoculadas, e painel inferior às plantas não inoculadas onde: MM = ‘Moneymaker’ (controle suscetível); OHIO = ‘Ohio 8245’ (parental suscetível); TX = ‘TX-468-RG’ (parental resistente) e F1 = população proveniente do cruzamento de ‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’. Avaliação realizada aos 25 dias após inoculação. Os números na parte superior indicam o número das plantas avaliadas e X = planta morta..... | 126 |
| <b>Figura 4</b> - Distribuição de famílias F <sub>2:3</sub> avaliadas via severidade de sintomas. As famílias foram provenientes do cruzamento de ‘Ohio 8245’ (parental suscetível) x ‘TX-468-RG’ (parental resistente) inoculadas com o begomovírus monopartido <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -Israel (TYLCV-IL) mediante clone viral infeccioso via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....   | 127 |

**CAPITULO 7 - Identificação de marcadores RAPD ('Randomly Amplified Polymorphic DNA') associados com a resistência de 'TX-468-RG' (gene *tcm-1*) ao begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV).....** 129

**Figura 1** - Padrão de amplicons RAPD obtidos usando como molde amostras de DNA genômico de *Solanum lycopersicum* provenientes do cruzamento de 'Ohio 8245' (suscetível a begomovírus) x 'TX-468-RG' (resistente a begomovírus, gene *tcm-1*) e dos dois parentais. Colunas: 01 a 81: Indivíduos de F2 fenotipados como suscetíveis e OH: Parental suscetível. M: Marcador Molecular 1Kb DNA Plus Ladder. Colunas 13 a 137: Indivíduos de F2 fenotipados como resistentes e TX: Parental resistente. Marcadores OP-X6 em (A), OP-R4 em (B) e OP-M18 em (C)..... 142

**Figura 2** - Padrão de amplicons RAPD obtidos usando como molde amostras de DNA genômico de *Solanum lycopersicum* provenientes do cruzamento de 'Ohio 8245' (suscetível a begomovírus) x 'TX-468-RG' (resistente a begomovírus, gene *tcm-1*) e dos dois parentais. Colunas: 01 a 81: Indivíduos de F2 fenotipados como suscetíveis e OH: Parental suscetível. M: Marcador Molecular 1Kb DNA Plus Ladder. Colunas 13 a 137: Indivíduos de F2 fenotipados como resistentes e TX: Parental resistente. Marcadores OP-G16 em (A), OP-T18 em (B)..... 143

## RESUMO

O tomateiro é uma das hortaliças mais importantes no Brasil tanto em área cultivada como pela importância sócio-econômica, entretanto o seu cultivo no país e no mundo tem sido severamente afetado por espécies de *Begomovirus* (família *Geminiviridae*). Estes vírus são transmitidos eficientemente pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*), importante inseto-praga, responsável por perdas quantitativas e qualitativas nesta cultura. Espécies de *Begomovirus* podem apresentar o genoma constituído por um ou dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B), sendo denominados monopartidos e bipartidos respectivamente. A maioria das espécies do ‘complexo viral’ conhecido como ‘Tomato yellow leaf curl disease’ (TYLCD) apresenta genoma monopartido, entretanto, espécies relatadas no Brasil são de begomovírus bipartidos, cuja incidência e severidade foram significativamente ampliadas com a introdução no país do biótipo B de *B. tabaci*, que contribuiu também para o aumento da diversidade de espécies destes vírus no país. Devido a essa grande diversidade de espécies virais, aliada à desvantagens de controle químico do vetor, a melhor opção para o controle de begomovírus vem sendo o emprego de cultivares resistentes ao vírus e/ou ao vetor. Programas de melhoramento tem se baseado na introgressão de genes de resistência presentes em espécies silvestres de *Solanum* para a espécie cultivada *S. lycopersicum*. Recentemente foi identificada no Brasil (Embrapa Hortaliças) uma fonte de resistência recessiva monogênica (gene *tcm-1*) na linhagem de tomate ‘TX-468-RG’ de *S. lycopersicum*, derivada do híbrido ‘Tyking’, frente à begomovírus monopartidos e bipartidos. Esta resistência se caracteriza pela ausência de sintomas de infecções virais e limitação da acumulação sistêmica de vírus nos tecidos infectados. ‘TX-468-RG’ constitui uma fonte promissora para programas de melhoramento, no entanto, marcadores moleculares para esse gene ainda não estão disponíveis limitando a incorporação deste ‘locus’ *tcm-1* em linhagens de tomateiro via melhoramento assistido. Neste contexto, este trabalho visou aprofundar a caracterização da resistência presente em ‘TX-468-RG’. Inicialmente, avaliou-se o comportamento de cinco híbridos comerciais de tomate para indústria, amplamente cultivados no Brasil Central, e do híbrido ‘HEI-036’ (contendo o gene *Ty-1* em heterozigose) em diferentes épocas de infecção por *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Diferenças significativas para a maioria dos componentes

analisados foram detectadas entre grupos contrastantes de inoculação. O híbrido ‘HEI-036’ mostrou-se promissor exibindo resistência ao ToSRV, além de alto potencial produtivo. Observou-se também que plantas expostas a pressões elevadas de moscas-brancas virulíferas até os 36 dias após semeadura apresentaram perdas severas de produtividade, podendo esse dano ser atenuado via utilização de técnicas adequadas de manejo em combinação com a adoção de cultivares com resistência genética (ex. gene *Ty-1*) (Capítulo 2). No Capítulo 3, acessos de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) foram avaliados em busca de resistência simultânea a begomovírus e nematóides, dois dos principais grupos de patógenos que causam prejuízo à cultura do tomateiro. Considerando que genes de resistência a begomovírus podem estar ligados em repulsão com o gene que confere resistência a *Meloidogyne* spp., buscou-se obter resistência simultânea a esses patógenos. O begomovírus bipartido *Tomato rugose mosaic virus*, ToRMV, os monopartidos *Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV, bem como as espécies *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* foram usados na avaliação de resistência. Alguns acessos combinaram alto nível de resistência a begomovírus e também a nematóides. Para begomovírus, observou-se uma diversidade de fatores de resistência mediando a reação dos acessos testados frente à infecção de begomovírus bipartidos e monopartidos no gênero *Solanum* (Seção *Lycopersicon*). Neste trabalho, fontes de resistência à mosca-branca também foram avaliadas usando como critério de seleção a redução do número de ovos e pupas presentes em amostras foliares. O acesso ‘LA 716’ apresentou elevados níveis de resistência à mosca-branca (Capítulo 4). Aspectos epidemiológicos e possíveis mecanismos envolvidos na infecção por begomovírus foram avaliados estudando o efeito de uma linhagem resistente de tomate na dispersão do vírus pelo vetor e na translocação viral nos tecidos infectados de plantas resistentes. Estudos foram conduzidos com a linhagem ‘TX-468-RG’, resistente a begomovírus monopartidos e bipartidos. A resistência de ‘TX-468-RG’ a *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL) resultou na restrição da acumulação viral, inclusive em condições de fluxo contínuo de vírus, bem como resultou na redução da dispersão primária e secundária do vírus. Os resultados permitem concluir que a incorporação e o uso desta fonte de resistência poderão ter impactos epidemiológicos positivos no manejo das espécies virais limitando a dispersão dos vírus em condições de campo (Capítulo 5). Como ‘TX-468-RG’ também demonstrou ser resistente a espécies de

begomovírus bipartidos devido a não manifestação de sintomas e redução da acumulação viral, o mesmo impacto epidemiológico é esperado no manejo de begomovírus bipartidos empregando-se essa fonte de resistência. Para determinar se o (s) mesmo (s) fator (es) genético (s) presente em 'TX-468-RG' controla (m) resistência à espécies de *Begomovirus* monopartidos e bipartidos, avaliaram-se famílias F<sub>2:3</sub> frente ao TYLCV-IL. Os resultados confirmaram uma herança monogênica recessiva mediando a resistência a monopartidos, e esses dados serão posteriormente, comparados com a avaliação das mesmas famílias F<sub>2:3</sub> frente a begomovírus bipartidos, que será realizada no Brasil sob condições controladas (Capítulo 6). O Capítulo 7 apresenta os dados sobre a identificação de marcadores do tipo RAPD associados com resistência a begomovírus bipartido encontrada na linhagem 'TX-468-RG' ('locus' *tcm-1*). Foram testados 520 'primers' da OPERON nos parentais suscetível e resistente e na população segregante F<sub>2</sub> proveniente do cruzamento 'Ohio 8245' x 'TX-468-RG'. Após avaliações sucessivas desse conjunto de 'primers', sete marcadores RAPD foram identificados ligados em associação e em repulsão com a região genômica contendo 'locus' *tcm-1*. A informação de sequências destes amplicons RAPD poderá ser utilizada na síntese de 'primers' para convertê-los em outra classe de marcadores mais estáveis (SCARs) para serem utilizados em uma plataforma de seleção assistida visando monitorar a incorporação da resistência derivada de 'TX-468-RG' em linhagens elite de tomate.

## SUMMARY

Tomato represents of one of the most an important horticultural crops cultivated in Brazil. This crop has been drastically affected by *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) infection. These viruses are efficiently transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci*) causing severe damages to the crop. The *Begomovirus* comprises viruses with a circular ssDNA genome, and could be divided in monopartite and bipartite species according to their genome composition (DNA-A and/or DNA-B). The *Tomato yellow leaf curl disease* (TYLCD) complex comprises several species of monopartite begomoviruses and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) is considered the prevalent and the most severe begomovirus species in tomatoes growing areas. In Brazil, so far, only bipartite

begomoviruses have been reported. Their incidence and severity in the country has drastically increased after the introduction of the biotype B of *B. tabaci*. This new vector also contributed for increasing diversity of begomovirus species. Due to begomovirus diversity and the difficulties to control their vector, breeding strategies aiming to introgress resistance to begomoviruses from wild species of *Solanum* to cultivated *S. lycopersicum* has been considered the best control measure. Recently, a recessive resistance to monopartite and bipartite begomoviruses found in the Brazilian line 'TX-468-RG' conferred by the *tcm-1* gene derived from the hybrid 'Tyking' was identified. This resistance is characterized by absence of symptoms and restriction of virus accumulation in infected tissues. Therefore, 'TX-468-RG' represents an important source of begomovirus resistance. However, no molecular markers are available to be used in assisted breeding for introgression of the *tcm-1* 'locus' into elite tomato lines. In this context, this work aimed to further characterize the resistance present in the line 'TX-468-RG' comparing this gene with other resistance genes available in commercial lines of tomato. Firstly, the performance of five commercial hybrids for tomato processing largely cultivated in Central Brazil and the hybrid 'HEI-036' (harboring the *Ty-1* gene) were compared at different times of infection by *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) before and after transplanting to the field. Significant differences in all agronomical parameters analyzed were observed among the materials. The hybrid 'HEI-036' demonstrated the best performance showing resistance to ToSRV, in addition, to high fruit yield. The plants exposed to high population of viruliferous whiteflies until 36 days after sowing showed a drastic reduction in tomato production; however, a correct management by adopting cultivation measures and genetic resistance (eg. *Ty-1* gene) could reduce these losses (Capítulo 2). In Chapter 3, *Solanum* accessions were evaluated for simultaneous resistance to begomoviruses and nematodes, considering that resistance genes to these two pathogen groups seem to be present in a repulsion-linkage phase. Monopartites (*Tomato yellow leaf curl virus* - TYLCV and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* - TYLCSV) and bipartites (*Tomato rugose mosaic virus*- ToRMV) begomoviruses and *Meloidogyne* (*M. incognita* and *M. javanica*) species were employed for screening for simultaneous resistance. Few accessions combined high resistance levels to begomoviruses and nematodes. The performance of the accessions challenged with begomoviruses, indicated the possible existence of several host determinants driven the resistance to

monopartite and bipartite begomoviruses in these accessions of *Solanum* (Section *Lycopersicon*) tested. In this work, resistance to the whiteflies were also assayed, based on reduction of the insect colonization (measured by the amount of eggs and pupae found in infested leaves). The accession 'LA 716' presented high levels of resistance to the whiteflies (Chapter 4). The effects on virus epidemiology and the possible mechanisms involved in virus resistance were studied by using the resistance line 'TX-468-RG' harboring the *tcm-1* gene. The resistance of 'TX-468-RG' to the monopartite *Tomato yellow leaf curl virus* - Israel (TYLCV-IL) resulted in restriction of virus accumulation in infected tissues even under a constant virus supply (by grafting of infected tissues). Also, the use of this resistant line reduced primarily and secondary virus dispersion by the vector. These results suggest that the use of resistant lines could have a positive impact by reducing virus spread under field conditions. (Capítulo 5). Since 'TX-468-RG' also showed resistance to bipartite begomoviruses, similar epidemiological impact could be expected by using this resistance line to control these viruses. Aiming to determine if the same genetic determinants are responsible for the resistance to monopartite and bipartite begomoviruses, F<sub>2,3</sub> families derived from 'Ohio 8245' x 'TX-468-RG' were challenged with TYLCV-IL. The results confirmed the recessive monogenic genetic control of this resistance and these results will be compared with the same experiments that will be performed in Brazil with the bipartite begomoviruses (Capítulo 6). The Chapter 7 presented the data obtained after evaluation of 520 primers (OPERON family) using a segregant F<sub>2</sub> population originated from the crossing between Ohio 8245' and 'TX-468-RG'. After a massive RAPD evaluation, a set of seven primers found in association or repulsion with the genomic region potentially hosting the 'loci' of *tcm-1* was selected. Further sequencing information of these amplicons, will allow the these conversion RAPD by markers to SCAR markers, which are much more stable and useful for introgressing the resistant determinants derived from 'TX-468-RG' into elite tomato lines.

## INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) tem como centro de origem as ilhas Galápagos (Darwin *et al.*, 2003 e Peralta *et al.*, 2005), Chile, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia (Rick & Holle, 1990; Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995 e Fontes & Silva, 2002). O tomateiro está classificado na família *Solanaceae*, gênero *Solanum* seção *Lycopersicon* (Peralta *et al.*, 2005). Este gênero abrange 13 espécies que podem ser agrupadas em dois complexos de acordo com a presença de barreiras de cruzamento com a espécie cultivada *S. lycopersicum*: o complexo *Esculentum* e o complexo *Peruvianum* (Peralta *et al.*, 2005).

O cultivo do tomateiro foi introduzido em quase todos os países (Fontes & Silva, 2002) e em poucos anos a tomaticultura espalhou-se em todos os continentes. A cultura apresenta grande importância econômica no País pelo volume e valor da produção. Atualmente, o Brasil ocupa a nona posição no ‘ranking’ mundial, com produção de 3,4 milhões de toneladas, sendo a região Sudeste a maior produtora, responsável por 43% do total produzido (CNPQ, 2008). O cultivo do tomateiro em quase todas as regiões brasileiras e praticamente o ano todo propicia condições favoráveis ao desenvolvimento de pragas e patógenos, tanto em lavouras destinadas ao consumo *in natura* como para indústria (Souza & Reis, 2003).

De acordo com Brown *et al.* (1995), as ‘begomoviroses’ estão entre as principais doenças da cultura no mundo, constituindo um sério problema em regiões tropicais e subtropicais (Varma & Malathi, 2003 e Seal *et al.*, 2006). No Brasil, em estudos de infecção precoce de begomovírus em ‘Viradoro’ (cultivar suscetível) foi verificada redução na produção total e no número de frutos por planta, em torno de 60% em ambos os casos (Giordano *et al.*, 2005a).

As espécies de *Begomovirus* (*Geminiviridae*) podem apresentar genoma composto por um ou dois componentes genômicos, sendo denominadas de monopartidas ou bipartidas, e são transmitidas por mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genn.). O complexo de espécies de *Begomovirus* monopartidas, conhecido como ‘Tomato yellow leaf curl disease’ (TYLCD) é considerado o principal fator limitante para a produção de tomate em diversos países e até o momento todas as espécies encontradas no Brasil apresentam genoma bipartido.



A introdução no Brasil de *Bemisia tabaci* biótipo B no início da década de 1990 contribuiu significativamente para o aumento na incidência e severidade das ‘begomoviroses’, bem como, para o aumento na diversidade de espécies e número de recombinantes entre elas (França *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003 e Inoue-Nagata *et al.*, 2006).

Diante da diversidade de espécies de *Begomovirus* infectando tomateiros e as desvantagens apresentadas pelo controle do inseto vetor, a melhor opção para o controle desses patógenos tem sido o uso de cultivares resistentes. Dessa forma, as principais estratégias do melhoramento têm sido a busca de fontes com amplo espectro de resistência e/ou a ‘piramidização’ de diferentes genes de resistência em linhagens elite. Na busca de germoplasma com potencial para uso em programas de melhoramento genético, várias fontes de resistência a begomovírus foram identificadas em espécies selvagens do gênero *Solanum* (Ferreira *et al.*, 1999; Giordano *et al.*, 1999; Picó *et al.*, 1999; Pilowsky & Cohen, 2000 e Santana *et al.*, 2001).

*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *tcm-1* e *tgr-1* são alguns dos genes/‘loci’ que estão sendo empregados em programas de melhoramento para resistência a begomovírus. *Ty-1* foi introgridido em *S. lycopersicum* (seção *Lycopersicon*) a partir de *S. chilense* (Dunal) Reiche (Michelson *et al.*, 1994 e Zamir *et al.*, 1994). *Ty-2* foi introgridido na espécie cultivada a partir de *S. habrochaites* Knapp & Spooner (Hanson *et al.*, 2000 e Lapidot & Friedmann, 2002). *Ty-3* deriva de *S. chilense* ‘LA-2779’ e confere alto nível de resistência a TYLCV (Ji & Scott, 2006). O gene *tcm-1* está presente na linha de *S. lycopersicum* ‘TX-468-RG’ (derivada do híbrido ‘Tyking’) (Giordano *et al.*, 2005b). ‘FLA-653’ é a fonte do gene recessivo *tgr-1* derivado de cruzamentos múltiplos envolvendo *S. chilense* ‘LA-2779’ e ‘Tyking’ (Bian *et al.*, 2007).

Durante o processo de melhoramento, vários genes de resistência a diferentes tipos de patógenos têm sido introgrididos em tomateiro provenientes de distintos acessos de espécies selvagens. Uma característica interessante é que muitos destes genes de resistência, foram mapeados no cromossomo 6, dentre eles os genes/‘loci’ *Mi* e *Ty-1* (Messeguer *et al.*, 1991; Michelson *et al.*, 1994 e Zamir *et al.*, 1994). O gene *Mi* foi introgridido na espécie cultivada a partir de *S. peruvianum* L. (Smith, 1944) e confere resistência a algumas espécies de *Meloidogyne*, causadoras de galhas radiculares em tomateiro (Ammati *et al.*, 1985). Em

alguns acessos os genes *Mi* e *Ty-1* parecem estar ligados em repulsão, como em *S. peruvianum* ‘PI 128657’, resistente a *Meloidogyne* spp. e suscetível a espécies de *Begomovirus* (*Mi/Mi* e *ty-1/ty-1*) e *S. chilense* ‘LA-1969’, resistente a espécies de *Begomovirus* e suscetível a *Meloidogyne* spp. (*mi/mi* e *Ty-1/Ty-1*) (Castro *et al.*, 2007), dificultando assim a obtenção de cultivares resistentes aos dois patógenos. A identificação de acessos combinando resistência simultânea às espécies de *Begomovirus* e *Meloidogyne* spp. facilitaria o desenvolvimento de cultivares expressando estas duas características desejáveis.

O gene *tcm-1* é outro gene de resistência a begomovírus que vem sendo empregado no melhoramento genético do tomateiro. Este gene foi identificado na linhagem ‘TX-468-RG’ derivada do híbrido ‘Tyking’ e confere resistência recessiva ao begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus* - ToCMoV (Giordano *et al.*, 2005b) e também a espécies do ‘complexo viral Tomato yellow leaf curl disease’ (TYLCD), manifestando-se neste caso, na limitação da acumulação sistêmica viral e ausência de sintomas (García-Cano *et al.*, 2008). Ainda não foram conduzidos estudos indicando a localização cromossômica do gene *tcm-1*.

Devido à grande importância da cultura do tomate e diante da problemática enfrentada com as ‘begomoviroses’, o objetivo principal desse trabalho foi a caracterização de genes e mecanismos de ação envolvidos na resistência ampla a begomovírus monopartidos e bipartidos em tomate. As estratégias experimentais envolveram a avaliação de *Ty-1* em condições de heterozigose e comparação de um híbrido contendo este gene com outros híbridos que não contem genes de resistência a begomovírus bipartidos; busca de novas fontes de resistência a espécies de *Begomovirus* e de *Meloidogyne* em genótipos silvestres e cultivados de tomate; desenvolvimento de marcadores moleculares para o gene *tcm-1*, estudo do mecanismo de resistência que opera na linha ‘TX-468-RG’ (contendo o gene *tcm-1*) bem como, aspectos epidemiológicos de seu cultivo como estratégia de controle e comparação desta resistência frente às espécies de *Begomovirus* monopartidos e bipartidos e ainda, avaliação de espécies de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) com diferentes níveis de resistência/suscetibilidade à mosca-branca quanto à resposta à infecção por begomovírus, tendo como objetivo estimar os efeitos potenciais da resistência ao inseto-vetor na transmissão/incidência desta virose. Todas essas estratégias visam dar suporte a programas

de melhoramento de tomateiro buscando a obtenção de resistência ampla, estável e duradoura a begomovírus.

## Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

### 1. Origem, taxonomia, importância e patógenos da cultura

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil e no mundo. É uma dicotiledônea autógama com taxa de cruzamento natural variando de 1 a 3%. Esta espécie tem como centro de origem as ilhas Galápagos (Darwin *et al.*, 2003 e Peralta *et al.*, 2005), norte do Chile, regiões andinas do Peru, Bolívia, Equador e sul da Colômbia (Rick & Holle, 1990; Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995 e Fontes & Silva, 2002). O tomateiro pertence ao gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*) e está classificado na família *Solanaceae* (Peralta *et al.*, 2005). *Solanaceae* é uma família botânica extremamente diversificada em hábito, morfologia e ecologia. A família *Solanaceae* é cosmopolita, tendo representantes em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. A maioria das espécies, no entanto, concentra-se principalmente nas Américas do Sul e Central. Os estudos taxonômicos mais recentes indicam que a família engloba 98 gêneros e 2700 espécies, sendo aproximadamente 1500 classificadas no gênero *Solanum* (Frodin, 2004).

O cultivo do tomateiro foi, muito provavelmente, levado pelos povos incas até a região sul do México, onde habitavam os astecas (Pazinato & Galhardo, 1997). Existem controvérsias sobre o centro de domesticação da espécie. Os nomes *mala peruviana* ou *pomi del Peru* atribuídos ao tomate por botânicos do século XVI, levaram Candolle em 1883 (apud Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995) a supor que o Peru provavelmente seria o centro de domesticação, entretanto estudos históricos e eletroforéticos de aloenzimas parecem indicar que foi no México onde ocorreu a domesticação do tomate, em especial na região de Puebla e Vera Cruz (Maranca, 1981). O tomate foi introduzido em quase todos os países e em poucos anos espalhou-se pelos diferentes países da América e do Velho Mundo.

O gênero *Solanum* seção *Lycopersicon* abrange 13 espécies (Tabela 1) agrupadas em dois complexos de acordo com a possibilidade de cruzamento fácil com *Solanum lycopersicum*. O complexo *Esculentum* abrange: *Solanum lycopersicum*, *Solanum cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg, *Solanum pimpinellifolium* L., *Solanum chmielewskii* (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen, *Solanum*

*neorickii* (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen, *Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner e *Solanum pennellii* Correll (Peralta *et al.*, 2005). A maioria destas espécies é silvestre e não explorada, uma vez que seus frutos são pequenos e algumas vezes pubescentes; entretanto são utilizadas em programas de melhoramento para introgressão de genes de resistência a patógenos, insetos e melhoria de aspectos de qualidade nutritiva (Lourenção *et al.*, 1999; Silva & Giordano, 2000; Aragão *et al.*, 2002 e Gordillo *et al.*, 2008). Já o complexo Peruvianum inclui as espécies: *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, *Solanum peruvianum* L, *Solanum arcanum* Peralta, *S. corneliomuelleri* J.F. Macbr., e *S. huaylasense* Peralta.

O tomate está entre as olerícolas mais conhecidas e consumidas no mundo podendo ser usado para consumo *in natura* ou destinado ao processamento industrial. No Brasil, além do aspecto econômico, o cultivo do tomateiro é uma atividade de grande importância social como fonte geradora de empregos tanto na área rural como na área urbana, uma vez que esta hortaliça ocupa o segundo lugar em volume de produção/consumo, vindo logo após a batata (*Solanum tuberosum* L.) (CNPQ, 2008). O maior produtor mundial de tomate é a China, seguida dos Estados Unidos, Turquia, Índia, Egito, Itália e Irã (CNPQ, 2008). Atualmente, a Espanha ocupa o oitavo lugar e o Brasil a nona posição no 'ranking' mundial, com produção de 3,4 milhões de toneladas, sendo a região Sudeste a maior produtora, responsável por 43% do total produzido. A segunda maior região produtora é a região Centro-Oeste com 25% da produção nacional, onde apenas o estado de Goiás, produziu 802.128 toneladas de tomate em 2007, equivalente a 24% do total nacional (CNPQ, 2008).

A presença da cultura do tomateiro em quase todas as regiões brasileiras e praticamente o ano todo, propicia condições favoráveis ao desenvolvimento de pragas e patógenos, tanto em lavouras destinadas ao consumo *in natura*, como para indústria (Souza & Reis, 2003).

**Tabela 1** - Relação de espécies do gênero *Solanum* equivalentes às espécies do antigo gênero *Lycopersicum* (extraído de Peralta *et al.*, 2005).

| Espécie do gênero <i>Solanum</i>   | Equivalente em <i>Lycopersicon</i> *   |
|--|--|
| <i>S. arcanum</i> Peralta  | Parte de <i>L. peruvianum</i> (L). Miller  |
| <i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg   | <i>L. cheesmaniae</i> L. Riley**   |
| <i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche  | <i>L. chilense</i> Dunal   |
| <i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D. M. Spooner, G. J. Anderson & R. K. Jansen | <i>L. chmielewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle  |
| <i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr.   | Parte de <i>L. peruvianum</i> (L). Miller (Também conhecido como <i>L. glandulosum</i> C.F. Mull.) |
| <i>S. galapagense</i> S. Darwin & Peralta  | Parte de <i>L. cheesmaniae</i> (L) Riley (previamente conhecido como forma ou variedade minor)     |
| <i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D. M Spooner   | <i>L. hirsutum</i> Dunal   |
| <i>S. huaylasense</i> Peralta  | Parte de <i>L. peruvianum</i> (L). Miller  |
| <i>S. lycopersicum</i> L.  | <i>L. esculentum</i> Miller  |
| <i>S. neorickii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D. M. Spooner, G. J. Anderson & R. K. Jansen    | <i>L. parviflorum</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle)                                       |
| <i>S. pennellii</i> Correll  | <i>L. pennellii</i> (Correll) D Arcy   |
| <i>S. peruvianum</i> L.  | <i>L. peruvianum</i> (L). Miller   |
| <i>S. pimpinellifolium</i> L   | <i>L. pimpinellifolium</i> (L). Miller   |

\* Considerados sinônimos obrigatórios

\*\* Incorretamente publicado como *cheesmanii*

Espécies do gênero *Begomovirus* (*Geminiviridae*), atualmente, são as que mais danos econômicos trazem à cultura e podem ser consideradas limitantes à produção comercial de tomate no Brasil e no mundo (Seal *et al.*, 2006).

## **2. Família *Geminiviridae* - Gênero: *Begomovirus* monopartido e bipartido, organização genômica e expressão de proteínas**

### **2.1. Família *Geminiviridae* - Gênero: *Begomovirus* monopartido e bipartido**

A família *Geminiviridae*, considerada a mais numerosa dentre os vírus de planta, está representada atualmente por quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*) de acordo com a gama de hospedeiros, o tipo de vetor, a organização do genoma e o relacionamento filogenético (Fauquet & Stanley, 2005 e Fauquet *et al.*, 2008). Os vírus desta família apresentam DNA circular de fita simples encapsidados em partículas geminadas de morfologia icosaédrica (18-20 x 30-32 nm). Estes vírus apresentam alta taxa de recombinação, resultando no surgimento de novas espécies mais adaptadas e agressivas (Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999; Navas-Castillo *et al.*, 2000; Andrade, 2006 e Inoue-Nagata *et al.*, 2006).

O gênero *Mastrevirus*, espécie-tipo *Maize streak virus* (MSV), compreende 12 espécies definitivas e cinco tentativas. Estes vírus apresentam apenas um componente genômico com duas regiões intergênicas, sendo uma curta de, aproximadamente, 50 nucleotídeos e uma longa com, aproximadamente, 200 nucleotídeos. Existem duas ORFs (Open reading frame) no sentido viral: MP (proteína de movimento) e CP (capa protéica) e outras duas no sentido complementar rep A e rep B. As espécies de *Mastrevirus* infectam um restrito círculo de hospedeiras, limitados a espécies da família *Poaceae* (exceção para *Tobacco yellow dwarf virus* - TYDV e *Bean yellow dwarf virus* - BeYDV que infectam dicotiledôneas). Espécies de *Mastrevirus* são transmitidas de maneira circulativa por *Cicadulina mbila* Naude, cigarrinha da família *Cicadellidae* (Hull, 2002; ICTV e Fauquet *et al.*, 2008).

O gênero *Curtovirus*, espécie-tipo *Beet curly top virus* (BCTV), agrupa cinco espécies definitivas e uma tentativa que apresentam um único componente genômico com a região intergênica longa. Existem três ORFs no sentido viral e quatro no sentido complementar. Espécies de *Curtovirus* são transmitidas de maneira circulativa por cigarrinhas (*Circulifer tenellus* Baker) da família *Cicadellidae* para dicotiledôneas (Hull, 2002; ICTV e Fauquet *et al.*, 2008).

O gênero *Topocuvirus*, espécie-tipo *Tomato pseudocurly top virus* (TPTV), é monotípico e apresenta organização genômica semelhante aos curtovírus, entretanto é transmitido por *Micrutalis malleifera* Fowler (família *Membracidae*) para dicotiledôneas (Hull, 2002; ICTV e Fauquet *et al.*, 2008).

*Begomovirus* espécie-tipo *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) é composto, atualmente por 181 espécies definitivas e 87 tentativas, sendo que destas mais de 60 podem infectar o tomateiro. O genoma de begomovírus apresenta DNA circular de fita simples (ssDNA) com um ou dois componentes de DNA (Hull, 2002; ICTV e Fauquet *et al.*, 2008).

Cada componente genômico de begomovírus bipartido com aproximadamente 2,6 Kb é encapsidado separadamente em partículas geminadas sendo necessárias as duas moléculas de DNA para que a infecção ocorra. O DNA-A contém genes relacionados com replicação viral e síntese da capa protéica, enquanto o DNA-B possui genes associados ao movimento e expressão de sintomas (Timmermans *et al.*, 1994 e Brown, 1997).

Nos últimos anos tem crescido o número de relatos de begomovírus monopartidos associados a DNA satélite, também conhecidos como DNA- $\beta$ . A primeira indicação de um ssDNA satélite associado a *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) foi feita por Dry *et al.* (1997) na Austrália. Mais tarde, concluiu-se tratar de uma molécula de componente subviral defectivo. *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) foi o primeiro begomovírus associado a DNA- $\beta$ . Desde então, vários outros têm sido reportados e atualmente devido à importância e ao número crescente de relatos de DNA- $\beta$  associados ao gênero *Begomovirus*, um sistema de nomenclatura e classificação foi proposto para estes componentes, onde já se observam listadas 51 espécies (Briddon *et al.*, 2008).

Em tomateiro, os sintomas geralmente são amarelecimento na base dos folíolos e clareamento de nervuras evoluindo para mosaico. Estes sintomas normalmente são generalizados, seguidos de redução do crescimento e enrolamento dos bordos dos folíolos. A planta apresenta ainda redução floral, paralização do crescimento e conseqüentemente, perda na produção (Ribeiro *et al.*, 1994; Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996 e Bezerra *et al.*, 1997). Os sintomas podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento em que a planta foi infectada, a cultivar, os fatores ambientais e a ocorrência de infecções mistas.

Dentre os gêneros de *Geminiviridae*, *Begomovirus* é o mais importante, contando com um maior número de espécies e maior gama de hospedeiras (Polston & Anderson, 1999; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Morales & Anderson, 2001 e Freitas-Astúa *et al.*, 2002). Espécies de *Begomovirus* são consideradas as principais espécies de vírus a infectar o tomateiro no mundo (Brown *et al.*, 1995 e Seal *et al.*, 2006), já tendo sido relatadas mais de 60 espécies distintas capazes de infectar o tomateiro (Jones, 2003 e Marín, 2004). Espécies



do gênero provocam também perdas expressivas em outras culturas de importância econômica como pimentão (*Capsicum annum* L.), caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e fava (*Phaseolus lunatus* L.) (Faria & Zerbini, 2000 e Silva, 2006).

No Brasil, o primeiro relato de begomovírus em tomateiro foi feito em 1960 (Flores *et al.*, 1960), sendo identificado mais tarde como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Begomovírus foram detectados pela primeira vez no Distrito Federal (DF) em 1994 (Ribeiro *et al.*, 1994), expandindo-se por toda a região Centro-Oeste e no ano seguinte, observou-se um aumento na incidência e nas perdas de produção causadas por este grupo de vírus (Bezerra *et al.*, 1996). A partir de então foi observada a presença de begomovírus infectando tomateiros em Minas Gerais (MG) (Rezende *et al.*, 1996 e Zerbini *et al.*, 1996), Bahia (BA) (Ribeiro *et al.*, 1996), São Paulo (SP) (Faria *et al.*, 1997), Rio de Janeiro (RJ) (Almeida *et al.*, 1997a,b) e Pernambuco (PE) (Bezerra *et al.*, 1996). Em estudos de infecção precoce por begomovírus em ‘Viradoro’ (cultivar suscetível) foram verificadas reduções na produção total e no número de frutos por plantas em torno de 60% em ambos os casos (Giordano *et al.*, 2005a). Begomovírus também foram detectados na Serra de Ibiapaba, no Ceará (Lima *et al.*, 1999).

Trabalhos posteriores sugeriram a existência de uma grande diversidade de espécies de begomovírus em outras espécies de plantas, bem como uma grande diversidade genética de begomovírus em tomateiro (Ambrozevícius *et al.*, 2002 e Ribeiro *et al.*, 2003) com a descrição de novas espécies como o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Galvão *et al.*, 2003); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2006) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegário *et al.*, 2007), todas identificadas em Minas Gerais.

Assim, no Brasil, as espécies *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV); *Tomato golden mosaic virus* (TGMV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow spot virus* (TYSV) foram relatadas infectando tomateiro. Outras dez espécies já foram relatadas também, entretanto encontram-se classificadas como possíveis espécies novas, segundo os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

Fernandes *et al.* (2008) relataram a diversidade de begomovírus no Brasil, entre 2002 e 2004, particularmente na região central do País, mostrando a predominância de quatro

espécies: ToSRV, Tomato golden vein virus (TGVV), Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV), Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e duas prováveis espécies novas. Analisando a diversidade e prevalência de espécies virais em campos de produção destinados ao processamento industrial, Fernandes *et al.* (2008), relataram que, em MG e GO a espécie viral predominante de 2002 até 2004 foi ToSRV, entretanto, em GO, outras duas espécies TGVV e ToMoLCV foram detectadas em 2004, juntamente com outra provável espécie nova. Em campos destinados ao consumo *in natura*, a espécie viral predominante no DF foi TGVV seguido por ToSRV. Em 2004, o ToSRV foi a espécie predominante em SP, GO e DF, entretanto, em SP, esta espécie ocorria junto com ToYVSV, ao invés de TGVV. Em MG apenas TGVV foi encontrada e a espécie predominante na BA e em PE foi TMoLCV (Fernandes *et al.*, 2008).

De grande importância dentro do gênero *Begomovirus*, está o complexo de espécies monopartidas associadas ao TYLCV, sendo que TYLCV foi relatado pela primeira vez em Israel em 1939 e mais tarde denominado de *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL).

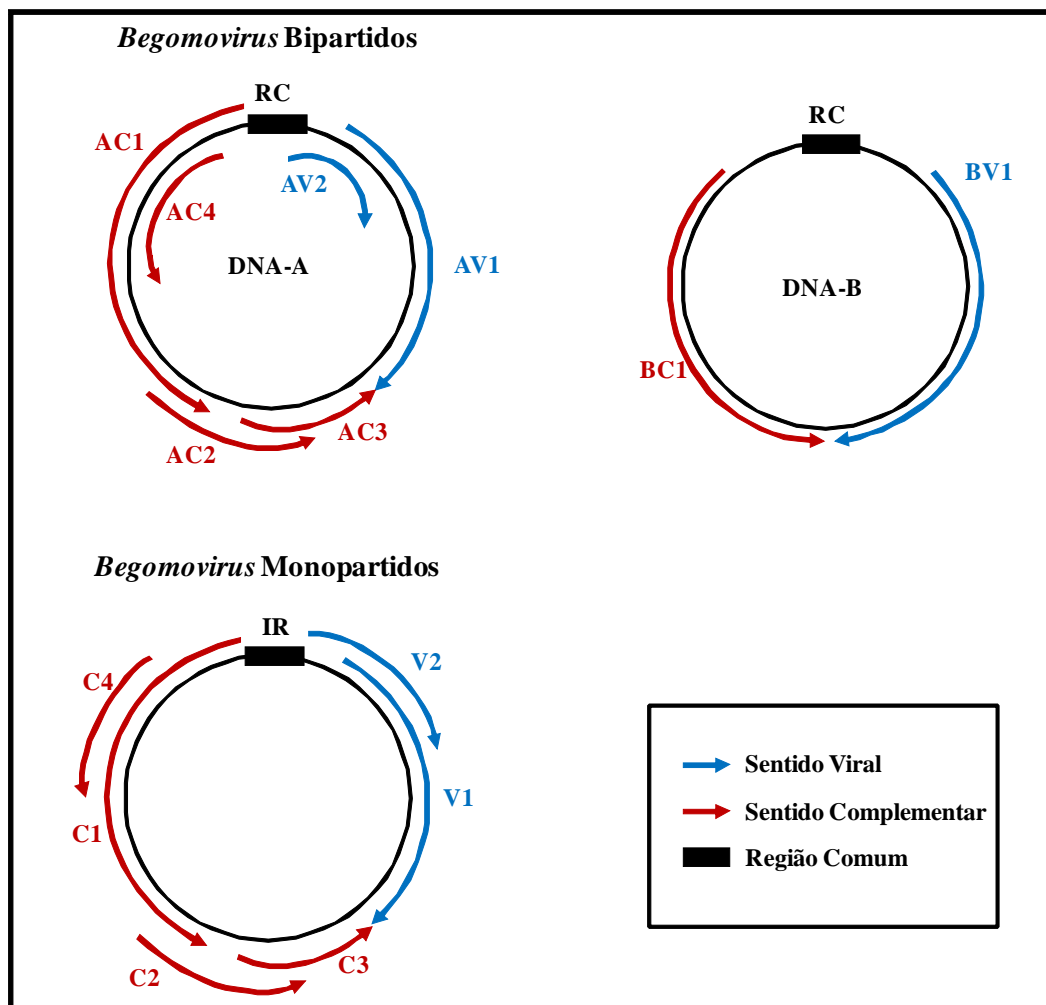
Atualmente estão descritas onze espécies virais associadas ao ‘complexo viral Tomato yellow leaf curl disease TYLCD’ em diferentes regiões do mundo: *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV); *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV); *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV); *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMalV); *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV); *Tomato yellow leaf curl Guandong virus* (TYLCGUV); *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV); *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV); *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) e as duas espécies reconhecidas recentemente *Tomato yellow leaf curl Vietnam virus* (TYLCVV) e *Tomato yellow leaf curl Indonesia virus* (TYLCIDV) (Fauquet *et al.*, 2008). Além disto, estão propostas outras cinco possíveis espécies novas segundo os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus.

Espécies deste ‘complexo viral TYLCD’ encontram-se amplamente distribuídas nas Américas, Europa, África e Ásia (Czosnek *et al.*, 1990; Ascencio-Ibanez *et al.*, 1999; Momol *et al.*, 1999; Polston & Anderson, 1999; Moriones & Navas-Castillo 2000, Valverde *et al.*, 2001 e Marín, 2004).

Um exemplo marcante da rápida disseminação desses patógenos pode ser observado na evolução da infecção ocorrida na região mediterrânea da Europa. A presença de begomovírus em cultivos de tomate na Espanha foi relatada pela primeira vez em 1992 (Moriones *et al.*, 1993) onde detectou-se *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV). Nos anos seguintes, epidemias causadas por espécies associadas ao TYLCD se estenderam para as principais regiões produtoras de tomate, constituindo o principal fator limitante para a produção.

## **2.2 Organização genômica e expressão de proteínas**

A maioria das espécies de begomovírus apresenta genoma formado por dois componentes de DNA circular fita simples (DNA-A e DNA-B) com cerca de 2600 pares de bases cada um e encapsidados por uma proteína estrutural arranjada na forma de 22 capsômeros para formar dois icosaedros incompletos de 18 x 30 nm (Bridson & Markham, 1995). Os dois componentes não apresentam identidade de sequência exceto por uma região comum (RC) de aproximadamente 200-250 pares de bases que é altamente conservada para os dois componentes (A e B) de uma mesma espécie viral. O componente A possui genes que codificam para replicação e encapsidação viral, enquanto os genes presentes no componente B codificam para proteínas requeridas para movimento viral (Timmermans *et al.*, 1994). Espécies monopartidas de begomovírus reúnem em apenas um componente todos os genes necessários para replicação, encapsidação e movimento viral. A organização genômica de *Begomovirus* monopartidos e bipartidos encontra-se representada na Figura 1.



**Figura 1-** Representação esquemática da organização genômica de begomovírus bipartidos e monopartidos. As setas indicam a posição dos genes e a direção em que ocorre a transcrição. Nomes e proteínas codificadas por estes genes encontram-se na Tabela 2. AV2: Presente em begomovírus originários da Europa, Ásia e África.

A região comum contém uma sequência de nove nucleotídeos TAATATTAC, conservada em todos os geminivírus e que constitui o domínio funcional da origem de replicação viral (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996).

O DNA-A tem o potencial de codificar de quatro a seis proteínas. Em espécies de *Begomovirus* bipartidos, o DNA-A apresenta uma ORF no sentido viral (AV1) que corresponde ao gene *cp* e codifica a proteína capsidial (CP) e três ORFs no sentido complementar (AC1, AC2 e AC3), correspondente aos genes *rep*, *trap*, *ren* as quais codificam a proteína associada à replicação (Rep), ativadora da transcrição (TrAP) e a

proteína potenciadora da replicação viral (REn), respectivamente (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997 e Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999) (Tabela 2).

O DNA-B possui duas ORFs, uma em sentido viral (BV1) correspondendo ao gene *ns* que codifica uma proteína que controla o movimento intracelular, núcleo-citoplasma e outra no sentido complementar (BC1) correspondente ao gene *mp* e que codifica a proteína responsável pelo movimento intercelular (Palmer & Rybicki, 1998).

Espécies de begomovírus que apresentam apenas um componente não possuem o DNA-B. O DNA-A codifica seis proteínas, duas em sentido viral V1 e V2 (codificando para CP e pré-capsida) e quatro em sentido complementar C1, C2, C3 e C4 codificando para REP, TrAP, REn e C4 respectivamente. Algumas das funções conhecidas destas proteínas encontram-se listadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Funções conhecidas de proteínas codificadas por espécies de *Begomovirus*.

| Gene           | Proteína                                     | Funções/referências*   |
|----------------|--|--|
| AV1<br>(ou V1) | CP<br><i>Coat Protein</i>                    | Transmissão e especificidade pelo vetor (1,2,3)*<br>Movimento sistêmico (4)*                     |
| AC1<br>(ou C1) | REP<br><i>Replication-Associated Protein</i> | Essencial para replicação do genoma viral (2)*   |
| AC2<br>(ou C2) | TrAp<br><i>Trans-Activating Protein</i>      | Transativadora de V1 e V2 (cp e ns) (2,3,5)*<br>(SGPT**) (6,7)*                                  |
| AC3<br>(ou C3) | REN<br><i>Replication -Enhancer Protein</i>  | Potenciadora da replicação viral (1,2,3)*  |
| AC4<br>(ou C4) | C4   | Expressão de sintomas e movimento viral (8,12)*<br>SGPT (begomovírus que infectam mandioca) (9)* |
| V2             | V2   | Expressão de sintomas e movimento viral (12)*  |
| BV1            | Nsp<br><i>Nuclear Shuttle Protein</i>        | Transporte intracelular de DNA (10)*   |
| BC1            | Mp<br><i>Movement Protein</i>                | Movimento célula-a-célula por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (11)*       |

\*Ref: 1) Bridson *et al.*, 1990. 2) Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999. 3) Höfer *et al.*, 1997. 4) Sinisterra *et al.*, 1999. 5) Faria & Zerbini, 2000. 6) Voinnet *et al.*, 1999. 7) Wang *et al.*, 2005. 8) van Wezel *et al.*, 2001. 9) Vanitharani *et al.*, 2004. 10) Sanderfoot *et al.*, 1996. 11) Noueir *et al.*, 1994. 12) Marin, 2004.

SGPT\*\* = Silenciamento gênico pós-transcricional.

### 3. *Bemisia tabaci*: características, hospedeiras, biótipos, transmissão de begomovírus, aspectos epidemiológicos e manejo de 'begomovirose'.

### 3.1. *Bemisia tabaci*: características, hospedeiras, biótipos e transmissão de begomovírus.

*Bemisia tabaci* Genn. amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, é considerada uma das mais destrutivas pragas para a agricultura (Figura 2) (Harrison, 1985; Perring *et al.*, 1993; Brown, 1994 e Polston & Anderson 1999). Além de causar danos diretos pela sucção de seiva, induz o amadurecimento irregular de frutos, favorece o aparecimento de fumagina (*Capnodium* spp.) e atua também como inseto-vetor de vírus.

*Bemisia tabaci* apresenta hábito alimentar polífago com pelo menos 600 espécies de plantas hospedeiras em 74 famílias botânicas, incluindo espécies de brássicas, euforbiáceas, cucurbitáceas, leguminosas, solanáceas, plantas ornamentais e daninhas (Brown *et al.*, 1995), sendo que plantas daninhas ocupam papel importante na manutenção de populações de *Bemisia*, bem como reservatório de espécies virais. De acordo com Villas Boas *et al.* (2003), várias espécies de plantas daninhas, dentre as quais *Crotalaria incana* L., *Datura stramonium* L., *Stachytarphetta cayenensis* (L.C. Rich) Vahl, *Galinsoga ciliata* (Raf.) Blake., *Leonotis nepetaefolia* (L.) R. Br, *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze, *Acanthospermum hispidum* DC, *Physalis angulata* L., *Richardia scabra* L., *Gomphrena celosiodies* Mart., *Lepidium virginicum* L., *Solanum americanum* Mill., *Sida urens* L., *Senna obtusifolia* L., *Chenopodium ambrosioides* L. e *Euphorbia heterophylla* L., contribuem para manutenção de populações da mosca-branca.

Os adultos da mosca-branca se caracterizam por possuírem dois pares de asas membranosas, recobertos por uma substância pulverulenta de cor branca, corpo amarelo-pálido recoberto por cera extra-cuticular e tamanho variando de 1 a 2 mm de comprimento, sendo as fêmeas maiores que os machos. Todos os estádios habitam a face inferior das folhas e apenas o adulto é capaz de migrar até novas plantas (Villas Boas *et al.*, 1997). Os ovos depositados pelas fêmeas na face abaxial das folhas (Chu *et al.*, 1995) podem estar isolados ou em grupos irregulares ou, ocasionalmente, formando semicírculos. Em plantas jovens de tomate, a maior parte dos ovos de *B. tabaci* é depositada na primeira folha terminal e em plantas velhas, estes são depositados na sexta folha considerando a coleta da parte superior para inferior (Toscano *et al.*, 2002a). Cada fêmea pode depositar de 130 a 300 ovos em média, durante o seu ciclo de vida (Gálvez & Morales, 1989 apud Silva, 2006).

*Bemisia tabaci* pertence à ordem *Homoptera*, subordem *Sternorrhyncha*, família *Aleyrodidae*, que apresenta outros quatro gêneros, *Aleurothrixus*, *Dialeurodes*, *Trialeurodes* e *Aleurodicus*. *Bemisia tabaci* foi originalmente descrita em 1889 na Grécia como *Aleyrodes*



**Figura 2** - Adulto de *Bemisia tabaci* alimentando-se em folha de tomate (*Solanum lycopersicum*).

*tabaci* com base em exemplares coletados em plantas de fumo e disseminou-se por todos os continentes, não sendo constatada sua presença apenas na Antártica (Gennadius, 1889 apud Morales, 2001; Oliveira *et al.*, 2001 e Perring, 2001).

Acredita-se que o gênero *Bemisia* tenha como provável centro de origem o Oriente, entretanto, existem dúvidas (Brown *et al.*, 1995). A primeira ocorrência de *B. tabaci* no Novo Mundo foi feita em 1897 em cultura de batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) nos Estados Unidos (Oliveira *et al.*, 2001).

No Brasil, a presença de *Bemisia tabaci* foi relatada ainda em 1928 sobre *Euphorbia pulcherrima* Willd. no estado da Bahia (Bondar, 1928 apud Lima *et al.*, 2000) e no começo dos anos 60 havia se tornado uma importante praga na agricultura (Lima *et al.*, 2002).

A partir da década de 50, foi proposta a existência de raças ou biótipos de *B. tabaci* devido à observação de que populações morfológicamente idênticas podiam apresentar características distintas quanto à transmissão de vírus e colonização de plantas (Brown *et al.*, 1995). Atualmente, variações em biótipos têm sido descritas em termos de gama de hospedeiros, comportamento na dispersão, resistência a inseticidas e transmissão de begomovírus (Berry *et al.*, 2004). O complexo encontra-se formado por aproximadamente 41 biótipos (de Barro *et al.*, 2005) sendo que o mais adaptado e mais amplamente distribuído é o biótipo B [anteriormente descrito como *Bemisia argentifolli* Bellows & Perring (Perring, 2001)].

O biótipo B de *B. tabaci* foi descrito inicialmente nos EUA no começo de 1980 (Costa & Brown, 1990) e introduzido no Brasil no começo da década de 90, tendo sido reportado em 1991/1992 em São Paulo (Lourenção & Nagai, 1994). Villas Bôas *et al.* (1997) e Haji *et al.* (1997) reportaram para o ano de 1993, a presença do biótipo associado a sintomas de begomovírus em culturas de tomate e repolho em áreas do Brasil Central. Nos últimos anos, o biótipo B vem se espalhando pelos estados do Brasil causando severas perdas. A presença do biótipo B foi confirmada em 20 estados brasileiros, sendo que em três estados (São Paulo, Mato Grosso e Goiás) observou-se a coexistência dos biótipos B e BR (Lima *et al.*, 2000).

Outro biótipo que vem atraindo a atenção nos últimos anos é o biótipo Q, exótico para o Brasil, é extremamente importante devido à similaridade com o biótipo B. Estes dois biótipos coexistem em algumas áreas do mundo (Moya *et al.*, 2001). Originário da Espanha, o biótipo Q logo se espalhou pela região mediterrânea (Brown, 2000; Moya *et al.*, 2001 e Marín, 2004), China (Chu *et al.*, 2001), Japão (Ueda & Brown, 2006), México, Estados Unidos e Guatemala (Brown, 2007) e Nova Zelândia (Scott *et al.*, 2007)

Devido às limitações na identificação morfológica dos biótipos de *Bemisia tabaci* várias técnicas moleculares têm sido empregadas, dentre as quais RAPD-PCR (Gawell & Barlett, 1993; Perring *et al.*, 1993; de Barro & Driver 1997 e Khasdan *et al.*, 2005) tem sido eficiente, principalmente, quando usada em conjunto com enzimas de restrição, sendo capaz de produzir padrões que permitem separar claramente os biótipos B, Q, M, S e T.

De acordo com Jones (2003), 114 espécies de vírus são transmitidas por espécies da família *Aleyrodidae*. Destas, 111 espécies são transmitidas por *Bemisia tabaci*. Das espécies transmitidas, 90% pertencem ao gênero *Begomovirus*, 6% ao gênero *Crinivirus* (*Closteroviridae*) e os 4% restantes são *Closterovirus* (*Closteroviridae*), *Ipomovirus* (*Potyviridae*) e *Carlavirus* (*Flexiviridae*).

A transmissão de begomovírus por *B. tabaci* é do tipo circulativa de maneira que o vírus após circular pelo corpo do inseto, atinge as glândulas salivares para ser, então, inoculado durante o processo de alimentação. O período mínimo de acesso de aquisição (PAA) e o período de acesso de inoculação (PAI) têm sido reportados para muitos vírus no Velho e Novo Mundo e de maneira geral varia, de 10 a 60 minutos e de 10 a 30 minutos, respectivamente (Idris & Brown, 1998 e Santos *et al.*, 2003). O período de latência após a



aquisição é de 17-20 horas e uma mosca adulta permanece virulífera de 7-20 dias (Mehta *et al.*, 1994).

As fêmeas de *B. tabaci* são capazes de transmitir TYLCV mais eficientemente que os machos (Cohen & Nitzany, 1966 e Caciagli *et al.*, 1995) e tanto larvas como adultos podem adquirir o vírus. Estudos têm mostrado ainda a transmissão entre indivíduos (transmissão horizontal) e para progênie (transmissão vertical) de algumas espécies de *Begomovirus* por *Bemisia tabaci* biótipo B.

De acordo com Ghanim e Czosnek (2000), fêmeas virulíferas (TYLCV) foram capazes de transmitir o vírus para machos não virulíferos e vice-versa. Para a mesma espécie viral, observou-se resultado similar usando o biótipo Q; entretanto, em ensaios cruzados, observou-se que machos virulíferos do biótipo B não transmitem para fêmeas avirulíferas do biótipo Q e vice-versa, mostrando incompatibilidade entre os dois biótipos (Ghanim *et al.*, 2007). As espécies de bipartidos *Squash leaf curl virus* (SLCV) e *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) também foram transmitidas de maneira horizontal pelo biótipo B de *B. tabaci* (Ghanim *et al.*, 2007).

Com relação à transmissão vertical, TYLCV foi transmitido para pelo menos duas gerações de *Bemisia tabaci* biótipo B (Ghanim *et al.*, 1998) e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) teve seu DNA, porém não infectivo, detectado em ovos, ninfas e adultos até a terceira geração (Bosco *et al.*, 2004).

De modo geral, o relacionamento entre espécies de *Begomovirus* e *Bemisia tabaci* tem sido amplamente estudado, entretanto muitas destas relações apresentam-se complexas, podendo haver ou não: replicação do vírus no inseto vetor, transmissão transovariana para a progênie e efeitos na fecundidade e longevidade do vetor (Hogenhout *et al.*, 2008). *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) aparentemente replica-se no vetor e reduz a sua longevidade. O contrário ocorre para *Tomato mottle virus* (ToMoV) (Sinisterra *et al.*, 2005 e Rubinstein *et al.*, 1997). Foi demonstrado também que TYLCV apresenta transmissão transovariana (Ghanim *et al.*, 1998) e pode também ser transmitido sexualmente (Ghanim *et al.*, 2000), entretanto Bosco *et al.* (2004) relataram a transmissão transovariana de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* TYLCSV, mas não de TYLCV. No caso de transmissão transovariana de TYLCSV, o DNA detectado na progênie não era infeccioso, não tendo assim relevância epidemiológica. Também foram relatados efeitos mutualísticos na interação

vetor-vírus, com aumento de fecundidade e longevidade de *B. tabaci* biótipo B após alimentar-se em plantas infectadas com *Tobacco curly shoot virus* (TbCSV) e *Tomato yellow leaf curl China virus* - TYLCCNV (Hogenhout *et al.*, 2008). De acordo com Hogenhout *et al.* (2008) a diversidade genética e a presença de DNAs subvirais são fatores que podem contribuir para estes resultados divergentes.

Estudos têm demonstrado ainda a importância de homólogos de proteínas chaperonas (Groel), produzidas por bactérias endossimbiontes de inseto na transmissão de vírus membros de *Begomovirus* e *Polerovirus* (*Luteoviridae*).

Dois tipos de microrganismos distintos estão presentes nos micetócitos de *B. tabaci* biótipo B. O endossimbionte predominante denomina-se tipo P e é altamente pleiomórfico, entretanto o tipo C, em forma de cocos, é o que mais se assemelha ao endossimbionte primário de afídeo (Clark *et al.*, 1992 e Bauman *et al.*, 1993), já tendo sido imunolocalizado homólogos da Groel neste tipo de bactéria (C) endossimbionte de *B. tabaci* (Morin *et al.*, 1999).

A sobrevivência de *Potato leafroll virus* (PLRV) (gênero *Polerovirus*, família *Luteoviridae*) depende de um homólogo da Groel (63-KDa) (Ishikawa, 1984) produzido pelo endossimbionte (*Buchnera* sp.) de *Myzus persicae* Sulzer. Homólogos da Groel, sintetizados por esta bactéria, além de terem sido encontrados em grande quantidade na hemolinfa do inseto, foram essenciais para persistência de luteovírus no corpo de *M. persicae* (Van den Huvel *et al.*, 1994 e 1997). Outros luteovírus e o TYLCV mostraram ainda alta especificidade por homólogos da Groel. Para TYLCV, após tratamentos com antissoro específico para Groel foi observada diminuição dos níveis destes homólogos no corpo do vetor, bem como perda da integridade capsidial e inibição da transmissão destes vírus (Morin *et al.*, 1999).

### **3.2. Aspectos epidemiológico e manejo de ‘begomoviroses’**

Devido à grande diversidade de espécies de *Begomovirus* existentes, medidas de controle devem ser adotadas em conjunto na tentativa de reduzir a população do inseto vetor, bem como o inóculo do vírus no campo.

O uso de químicos para o controle do inseto vetor além de oneroso polui o ambiente. Em alguns casos, tem sido considerado pouco eficiente, devido ao fato do rápido desenvolvimento de resistência aos produtos e a localização (face inferior da folha) dos estádios imaturos e adultos (Horowitz & Ishaaya, 1995).

Sendo assim, a melhor opção para o controle de begomovírus é o emprego de cultivares resistentes ao vírus e/ou ao vetor. Vários programas de melhoramento têm sido baseados na introgressão de genes de resistência presentes em espécies de *Solanum* para a espécie cultivada *S. lycopersicum*.

De acordo com Meagher Junior *et al.* (1997), a resistência de plantas a insetos apresenta grande potencial para uso em programas de manejo integrado de pragas (MIP). Esta resistência pode ser por mecanismos de antibiose, antixenose e tolerância (Painter 1951). Em algumas espécies de tomate, tricomas glandulares presentes em folhas e ramos, além de constituírem a base mecânica da resistência (Dimock & Kennedy, 1983), são responsáveis pela secreção de metabólitos, denominados aleloquímicos. Estes aleloquímicos podem resultar em efeito metabólico tóxico (antibiose) ou deterrente (não preferência). Dentre os efeitos tóxicos, podem ser citadas diversas alterações em fases do desenvolvimento do inseto como mortalidade das formas juvenis e nas fases de transformação para adulto, redução de tamanho, peso e fecundidade dos indivíduos, bem como alteração da proporção sexual e tempo de vida.

Com base no comprimento, presença ou ausência de glândulas na extremidade apical, têm sido identificados em espécies de *Solanum*, sete tipos de tricomas em dois grupos: glandulares (I, IV, VI e VII) e não glandulares (II, III e V) (Luckwill, 1943). Os tricomas glandulares apresentam uma glândula responsável pela secreção dos diferentes aleloquímicos, entre os quais 2-tridecanona (metil cetona) presente em *S. habrochaites* var. *glabratum*, secretado por tricomas tipo VI, zingibereno (sesquiterpenos) presente em *S. habrochaites* var. *habrochaites*, secretado por tricomas tipo IV, acilaçúcares (ésteres de glicose, sacarose e de grupos acilas com 4 a 12 átomos de carbono) presentes em *S. pennellii*, secretados por tricomas tipo IV (Burke *et al.*, 1987; Juvik *et al.*, 1988 e Aragão *et al.*, 2000).

A presença de alguns aleloquímicos tem sido associada à resistência de tomate a vários insetos, dentre eles a *Bemisia tabaci*. Acilaçúcares encontrados em *S. pennellii*,

identificados por Gentile *et al.* (1968) (apud Silva, 2006) foram relatados como fatores de resistência à mosca-branca (Azevedo *et al.*, 1999; Pamplona, 2001 e Resende, 2003), entretanto, existe uma grande variação entre os acessos quanto ao nível de acilaçúcares produzidos, além da influência de estresses ambientais e fatores meteorológicos (Shapiro *et al.*, 1994).

Os tricomas tipo VI estão presentes em todas as espécies de tomate, porém são mais abundantes em *S. habrochaites* e *S. habrochaites* f. *glabratum* que em *S. lycopersicum* (Maliepaard *et al.*, 1995 e Snyder *et al.*, 1998) que é considerada mais suscetível à mosca-branca quando comparada a espécies selvagens (Heinz & Zalon, 1995).

Em estudos de preferência entre genótipos de tomateiro para oviposição de *B. tabaci* biótipo B, Fancelli *et al.* (2003) constataram que *S. pennelli* 'LA 716' comportou-se como um dos menos atrativos, não tendo sido verificados adultos vivos nos folíolos abaxiais amostrados. Outros genótipos pouco atrativos também foram encontrados em *S. habrochaites* e *S. habrochaites* f. *glabratum*. Genótipos de *S. lycopersicum*, exceto Santa Clara, foram suscetíveis, conforme já citado de modo geral para espécies de *S. lycopersicum* (Heinz & Zalon, 1995).

Além de tomate (Toscano *et al.*, 2002b), cultivares resistentes à mosca-branca também foram relatadas para outras culturas como abóbora [*Cucurbita* spp. (Alves *et al.*, 2005), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (Toscano *et al.*, 2003) e soja (*Glycine max* (L) Merr (Lima & Lara, 2004 e Valle & Lourenção, 2002). Além disso, espécies selvagens de tomate também têm sido relatadas como resistentes à mosca-branca (Muigai *et al.*, 2002).

Quanto aos begomovírus, vários níveis de resistência a TYLCV e também aos isolados brasileiros foram encontrados em *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum habrochaites*, *Solanum peruvianum* e *Solanum chilense* (revisão em Picó *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 1999; Picó *et al.*, 1999; Pilowsky & Cohen, 2000 e Santana *et al.*, 2001).

Considerando-se a rapidez com que populações de *Bemisia tabaci* adquirem resistência a inseticidas e a identificação de potenciais fontes de resistência ao patógeno e ao vetor, as principais estratégias do melhoramento visando desenvolver cultivares com resistência durável e estável são: (1) busca de fontes com amplo espectro de resistência a begomovírus monopartidos e bipartidos e/ou (2) a 'piramidização' de diferentes genes de resistência em linhagens elite.

#### 4. Genes de resistência a doenças

O uso de terminologias relacionadas com a resposta de resistência de plantas a patógenos varia de acordo com autores, assim neste trabalho adotaremos a terminologia proposta por Cooper & Jones (1983), onde resistência e suscetibilidade são terminologias usadas para expressar a resposta da planta a infecção viral e tolerância e sensibilidade são utilizadas para expressar a resposta da planta a doença. Assim, uma planta resistente é aquela em que a replicação e/ou invasão viral está restrita, enquanto uma planta tolerante é aquela que mostra sintomas leves ou não perceptíveis.

Os programas de melhoramento têm sido baseados na introgressão de genes de resistência de espécies selvagens para a espécie cultivada *S. lycopersicum*. Em tomate, vários genes de resistência a pragas e patógenos, têm sido introgrididos de espécies selvagens (Tabela 3). Um grande número destes genes foram mapeados no cromossomo 6 de tomate. Dentre estes, *Cf-2* e *Cf-5* (resistência a *Cladosporium fulvum* Cooke), *Ol-1* e *Ol-3* (resistência a *Oidium lycopersici* Coolke & Masee), *Mi* (resistência a algumas espécies de nematóides do gênero *Meloidogyne*) e *Ty-1* (resistência a *Begomovirus* monopartidos e bipartidos).

Stevens & Rick (1988) citados por Dixon *et al.* (1996) relataram genes em tomate conferindo resistência a *Cladosporium fulvum*, dentre os quais *Cf-2*, *Cf-3*, *Cf-4*, *Cf-5* e *Cf-9*. Os genes *Cf-2* e *Cf-9* foram identificados em *Solanum pimpinellifolium*; *Cf-5* em *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Jones *et al.*, 1993). *Cf-4* e *Cf-9* foram mapeados no cromossomo 1 (Jones *et al.*, 1994 e Dixon *et al.*, 1996).

A resistência a *O. lycopersici* em GI1560 (*S. habrachoites*) foi mapeada no cromossomo 6 próximo aos genes *Mi* e *Cf-2* e *Cf-5*. Huang *et al.* (2000), relataram que o gene *Ol-3* (de GI1290), cuja resistência é do tipo dominância incompleta, estava associado a vários marcadores RFLP e SCAR e o mapearam entre RG25/SCAF10 e H9A11, próximo ao gene *Ol-1*.

A resistência conferida pelo gene dominante *Mi* (Gilbert & Mcguire, 1956) é proveniente de *S. peruvianum*. *Mi* pertence à família de genes de resistência contendo NBS-LRR (nucleotide-binding/leucine-rich repeat) e localiza-se no braço curto do cromossomo 6 (Milligan *et al.*, 1998).

Zamir *et al.* (1994) verificaram que a resistência da espécie selvagem *S. chilense* a *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) é conferida pelo gene *Ty-1* com dominância parcial. O gene *Ty-1* confere resistência a begomovírus monopartidos e bipartidos e tem a expressão fenotípica de tolerância aumentada em linhas homozigotas para *Ty-1*. Exemplos de genes de resistência a monopartidos e tipos de herança são ilustrados na Tabela 4.

Este gene *Ty-1* foi introgridido na espécie cultivada através de cruzamento interespecífico com *S. chilense* que engloba várias linhagens com alto nível de resistência a isolados de begomovírus da França, Israel, Flórida e Américas (Zakay *et al.*, 1991). O produto deste gene parece estar relacionado com a proteína de movimento viral (célula-a-célula), sendo mais eficiente em condições de baixa pressão de inóculo (Laterrot, 1993; Michelson *et al.*, 1994 e Zamir *et al.*, 1994). Vários estudos de herança também têm sugerido que o controle genético de resistência depende da combinação entre o acesso do banco de germoplasma e a espécie viral (Morales, 2001).

Outro ‘locus’/gene, o *Ty-2*, foi introgridido a partir da espécie *S. habrachoites* e tem mostrado níveis de resistência contra isolados asiáticos de begomovírus (Hanson *et al.*, 2000 e Lapidot & Friedmann, 2002). Estudos de mapeamento indicam que esse gene está localizado no cromossomo 11.

O gene *tcm-1* confere resistência aos begomovírus bipartidos (Giordano *et al.*, 2005a) e monopartidos (García-Cano *et al.*, 2008). Este ‘locus’/gene foi encontrado na linha ‘TX-468-RG’ de *S. lycopersicum* derivada do híbrido ‘Tyking’, já relatado como resistente a isolados de begomovírus do Velho Mundo (Laterrot, 1995).

O gene *tgr-1* presente em ‘FLA-653’, é derivado do cruzamento envolvendo *S. chilense* (‘LA-2779’) e Tyking (Bian *et al.*, 2007). De acordo com Bian *et al.* (2007) ‘Tyking’, cuja origem é desconhecida, deve contribuir com a resistência presente em ‘FLA-653’. *Ty-3* parcialmente dominante foi derivado de ‘LA-2779’ e confere alto nível de resistência a TYLCV e resistência a bipartidos (Ji & Scott, 2006).

Devido à grande variabilidade de espécies virais em nossas condições, a incorporação de diferentes genes/alelos tem sido preconizada como a estratégia mais apropriada visando resistência estável e ampla a estas enfermidades.

A piramidização de genes de resistência em uma linhagem ou cultivar é uma estratégia que permite acumular um conjunto de genes efetivos a um ou mais patógeno (s)

em um único genótipo (Vidavisky *et al.*, 2008) proporcionando assim uma resistência durável. Esforços devem ser concentrados na busca de diferentes fontes para posterior piramidização. Neste contexto, estes genes de resistência podem ser detectados mediante o uso de marcadores moleculares.

**Tabela 3** - Genes de resistência a insetos e patógenos (vírus, bactérias, nematóides e fungos) provenientes de diferentes fontes selvagens de *Solanum* spp. (adaptada de Foolad, 2007).

| <b>Grupo</b>                         | <b>Praga/Patógenos</b>   | <b>Fontes R/T* de <i>Solanum</i> spp.</b>   | <b>Cromossomos</b> |
|--------------------------------------|--|---|--------------------|
| Pulgão                               | <i>Macrosiphum euphorbiae</i>  | <i>S. peruvianum</i>  | 6                  |
| Bactérias                            | <i>Clavibacter michiganensis</i>   | <i>S. peruvianum</i> , <i>S. habrochaites</i>   | 1,5,6,7,8,9,       |
|                                      | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>  | <i>S. pimpinellifolium</i>  | 5                  |
|                                      | <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , <i>X. vesicatoria</i> , <i>X. peronans</i> , <i>X. gardneri</i>   | <i>S. lycopersicum</i> , <i>S. pennellii</i>  | 1,3,4,5            |
|                                      | <i>Ralstonia solanacearum</i>  | <i>S. pimpinellifolium</i> , <i>S. peruvianum</i>   | 3,4,6,7,10         |
| Fungos                               | <i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>  | <i>S. pennellii</i>   | 3                  |
|                                      | <i>Alternaria alternata</i>  | <i>S. cheesmaniiiae</i>   | 2,3,9,12           |
|                                      | <i>Pyrenochaeta lycopersici</i>  | <i>S. chilense</i>  | 12                 |
|                                      | <i>Alternaria solani</i>   | <i>S. habrochaites</i> , <i>S. pimpinellifolium</i>   | Vários             |
|                                      | <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i><br><i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | <i>S. peruvianum</i> / <i>S. pimpinellifolium</i> / <i>S. pennellii</i>                           | 9,7,8,11           |
|                                      | <i>Stemphylium</i> spp.  | <i>S. pimpinellifolium</i>  | 11                 |
|                                      | <i>Phytophthora infestans</i>  | <i>S. pimpinellifolium</i> , <i>S. habrochaites</i>   | 7,9,10             |
|                                      | <i>Cladosporium fulvum</i>   | <i>S. pimpinellifolium</i> , <i>S. habrochaites</i>   | 1,6                |
|                                      | <i>Verticillium dahliae</i>  | <i>S. lycopersicum</i> , <i>S. pennellii</i> , <i>S. cheesmaniae</i>                              | 9                  |
|                                      | <i>Leveillula taurica</i>  | <i>S. chilense</i>  | 12                 |
|                                      | <i>Oidium lycopersicum</i>   | <i>S. lycopersicum</i> , <i>S. habrochaites</i> , <i>S. neorickii</i>                             | 4,6,12             |
|                                      | Vírus  | <i>Tomato mottle virus</i>  | <i>S. chilense</i> |
| <i>Tomato spotted wilt virus</i>     |  | <i>S. peruvianum</i>  | 9                  |
| <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> |  | <i>S. lycopersicum</i> , <i>S. chilense</i> , <i>S. pimpinellifolium</i> , <i>S. habrochaites</i> | 6,11               |
| <i>Cucumber mosaic virus</i>         |  | <i>S. chilense</i>  | 12                 |
| Potyviroses                          |  | <i>S. peruvianum</i>  | 3                  |
| <i>Tobacco mosaic virus</i>          |  | <i>S. habrochaites</i> , <i>S. peruvianum</i>   | 2,9                |
| Nematóides                           | <i>Globodera rostochiensis</i>   | <i>S. pimpinellifolium</i>  | 4                  |
|                                      | <i>Meloidogyne</i> spp.  | <i>S. peruvianum</i>  | 6,12               |



**Tabela 4** - Fontes de resistência aos begomovírus do ‘complexo viral TYLCD’, seguindo a antiga nomenclatura do gênero (modificado de Marín, 2004).

| <b>Espécie</b>                                  | <b>Acesso</b>               | <b>Modo de Herança</b>             | <b>Referência</b>   |
|---|-----------------------------|------------------------------------|---|
| <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>            | LA 121                      | Monogênico. Dominância incompleta  | Pilowsky & Cohen, 1995  |
|   | LA 373                      | Poligênico. Parcialmente recessivo | Hassan <i>et al.</i> , 1982,  |
|   |                             | Poligênico. Parcialmente recessivo | Hassan <i>et al.</i> , 1982 e Kasrawi <i>et al.</i> , 1988  |
|   | LA 1579                     | Monogênico. Dominante              | Hassan <i>et al.</i> , 1982   |
|   | LA1589                      | Monogênico. Dominante              | Hassan <i>et al.</i> , 1982   |
|   | LA 1690                     | Monogênico. Dominante              | Hassan <i>et al.</i> , 1982   |
|   | Hirsute-INRA                | -                                  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988 e Kasrawi, 1989  |
|   | LA 1478                     | -                                  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988 e Kasrawi, 1989  |
|   | 69-187                      | Monogênico. Dominante              | Zamir <i>et al.</i> , 1994  |
|   | 75-298                      | Monogênico. Dominante              | Zamir <i>et al.</i> , 1994  |
|   | LA 1335                     | -                                  | Channarayappa <i>et al.</i> , 1992  |
| PI 19532  | -                           | Channarayappa <i>et al.</i> , 1992 |   |
| <i>Lycopersicon cheesmani</i> ssp. <i>minor</i> | LA 1401                     | Recessivo                          | Hassan <i>et al.</i> , 1982   |
| <i>Lycopersicon hirsutum</i>                    | LA 386                      | Poligênico. Dominante              | Channarayappa <i>et al.</i> , 1992; Hassan <i>et al.</i> , 1984 e Kasrawi <i>et al.</i> , 1988                            |
|   | LA1352                      | -                                  | Hassan <i>et al.</i> , 1982   |
|   | LA1691                      | -                                  | Hassan <i>et al.</i> , 1982   |
|   | f. <i>glabratum</i> LA 1624 | -                                  | Hassan <i>et al.</i> , 1982   |
|   | LA 1393                     | -                                  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988  |
|   | f. <i>glabratum</i> LA 1252 | -                                  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988  |
|   | LA 1777                     | -                                  | Channarayappa <i>et al.</i> , 1992; Czosnek <i>et al.</i> , 1993; Kunik <i>et al.</i> , 1994 e Zamir <i>et al.</i> , 1994 |
|   | H2-INRA                     | Recessiva                          | Zamir <i>et al.</i> , 1994 e Kasrawi & Mansour, 1994  |
|   | LA 771418                   | -                                  | Cohen & Antignus, 1994  |
|   | f. <i>glabratum</i> LA 407  | -                                  | Cohen & Antignus, 1994  |
|   | PI 34418                    | -                                  | Cohen & Antignus, 1994  |
|   | PI-390658                   | -                                  | Channarayappa <i>et al.</i> , 1992;   |
|   | PI-390659                   | -                                  | Channarayappa <i>et al.</i> , 1992;   |
|   | f. <i>glabratum</i> B6013   | Ty-2                               | Hanson <i>et al.</i> , 2006   |
| <i>Lycopersicon peruvianum</i>                  | LA 452                      | -                                  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988  |
|   | LA 462                      | -                                  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988  |
|   | LA 1333                     | -                                  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988  |

**Continuação...**

| <b>Espécie</b>                 | <b>Acesso</b>       | <b>Modo de Herança</b>                             | <b>Referência</b>  |
|--------------------------------|---------------------|--|--|
| <i>Lycopersicon peruvianum</i> | LA 1373             | -  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988   |
|                                | LA 1274             | -  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988   |
|                                | f. humifusum LA 385 | -  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988   |
|                                | PI-126935           | Poligênica (5 genes). Recessiva                    | Pilowsky & Cohen, 1990   |
|                                | 3407                | -  | Hassan <i>et al.</i> , 1982  |
|                                | 78-1556             | -  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988 e Kasrawi & Suwwan, 1989  |
|                                | 81-2274             | -  | Kasrawi <i>et al.</i> , 1988 e Kasrawi & Suwwan, 1989  |
|                                | PI-127831           | -  | Zamir <i>et al.</i> , 1994   |
|                                | CMV sel. INRA       | Dominância parcial                                 | Zamir <i>et al.</i> , 1994   |
|                                | PI-127831           | -  | Zamir <i>et al.</i> , 1994 e Kasrawi <i>et al.</i> , 1988  |
| <i>Lycopersicon chilense</i>   | LA 1969             | Monogênica. Dominância parcial (gene <i>Ty-1</i> ) | Czosnek <i>et al.</i> , 1993; Kunik <i>et al.</i> , 1994; Zamir <i>et al.</i> , 1994; Zeidan & Czosnek 1994, Zamir <i>et al.</i> , 1994 e Zakay <i>et al.</i> , 1991 |
|                                | LA 1938             | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA 1959             | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA1960              | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA1961              | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA 1963             | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA 1968             | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA 2762             | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA 2774             | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA 2779             | -  | Yassin, 1989   |
|                                | LA 1932             | <i>Ty-3</i> e <i>Ty-4</i>                          | Pietersen & Smith, 2002 e Ji & Scott, 2006   |
|                                | LA 1971             | -  | Picó <i>et al.</i> , 1999  |
|                                | LA 2884             | -  | Picó <i>et al.</i> , 1999  |

**5. Nematóides: o gênero *Meloidogyne*; resistência: gene *Mi*****5.1. Nematóides: o gênero *Meloidogyne***

Nematóides fitoparasitas pertencem à microfauna do solo e estabelecem seus sítios de alimentação nas raízes das hospedeiras, afetando tanto a absorção quanto a translocação de nutrientes, podendo predispor a planta a outros patógenos, ou ainda em alguns casos, atuando como vetores (Almeida & Decraemer, 2005). Estes patógenos são importantes endoparasitas de muitas culturas e causam perdas anuais de aproximadamente US\$100 bilhões em todo mundo (Cai *et al.*, 1997), destacando-se principalmente as espécies de *Meloidogyne*.

O primeiro relato de doenças causadas por espécies de *Meloidogyne* foi feito em 1855 por Berkeley na Inglaterra ao observar nodosidades em raízes de pepino (*Cucumis*

*sativus* L.) causadas por um pequeno verme, denominado de 'vibriosis'. A partir deste relato, muitos outros foram feitos em diferentes regiões e em diferentes hospedeiras. Em 1887, Goeldi estudando uma doença do cafeeiro (*Coffea* spp.), referida por Jobert em 1878, denominou o agente causal de *Meloidogyne exigua* Goeldi. A taxonomia do gênero sofreu algumas modificações durante os anos que se seguiram, entretanto Chitwood (1949, apud Tihohod, 1993) reestabeleceu o gênero (mantendo como espécie-tipo *M. exigua*) e descreveu cinco espécies e uma variedade (Moura, 1997).

Os nematóides das galhas, gênero *Meloidogyne*, família *Meloidogynae* (Subbotin *et al.*, 2006), polípagos e cosmopolitas, constituem um dos principais grupos de patógenos em diversas culturas no Brasil e no mundo (Sasser, 1980 e Williamson & Hussey, 1996). Estes patógenos são endoparasitas sedentários (Barker, 2003). Assim, dos ovos depositados pela fêmea eclodem os juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>), que atraídos por exsudatos produzidos pelas plantas penetram nas raízes e estabelecem os sítios de alimentação (células gigantes) junto ao sistema vascular. Após três ecdises estes atingem a fase adulta, sendo que os machos, filiformes, abandonam as raízes, enquanto as fêmeas, piriformes, passam a produzir ovos que são depositados em uma massa gelatinosa.

Os sintomas induzidos por espécies de *Meloidogyne* consistem em deformações do sistema radicular da hospedeira, culminando com a formação de galhas (hipertrofia e hiperplasia). Culturas de tomateiro infectadas apresentam plantas de porte reduzido, amareladas e com intensa murcha nas horas mais quentes do dia (Olthof & Potter, 1977 e Charchar *et al.*, 1998).

As perdas na produção devido ao ataque de espécies de *Meloidogyne* podem variar dependendo da espécie hospedeira. Em tomate, as perdas podem variar de 28,7 a 85 % (Ferraz & Churata-Masca, 1983; Lordelo, 1988 e Charchar *et al.*, 1998) sendo esta uma das hortaliças que mais sofre danos, principalmente por associação de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Reub) Chitwood.

Alqueives, plantas armadilhas, óleos essenciais, extratos aquosos ou etanólicos, uso de plantas de efeito antagônico ao nematóide como *Tagetes erecta* L. (Singh *et al.*, 2003), *Mucuna aterrina* (Piper & Tracy) Holland (Barcelos *et al.*, 1997) e *Crotalaria spectabilis* Roth (Silva *et al.*, 1989) são algumas medidas que quando usadas em conjunto podem contribuir para reduzir em parte a população do patógeno e conseqüentemente obter ganhos

em produtividade das culturas; entretanto, essas medidas podem não ser adotadas por não apresentarem efeitos imediatos. O uso de nematicidas geralmente além de ser oneroso, pode deixar resíduos nos alimentos. Desta forma o uso de cultivares resistentes é uma das medidas mais econômicas e tem reduzido consideravelmente danos a cultura (Jianhua *et al.*, 2001).

## **5.2. Resistência: gene *Mi***

Fontes de resistência ao nematóide das galhas foram encontradas em plantas silvestres de *S. peruvianum* (Bailey, 1941), no entanto, o cruzamento desta espécie com a espécie cultivada *S. lycopersicum* não era possível devido à incompatibilidade entre as duas espécies. Smith (1944) resolveu este problema através da técnica de cultura embrionária. Uma planta F<sub>1</sub> obtida do cruzamento das duas espécies citadas foi retrocruzada com *S. lycopersicum* e as progênies obtidas deste retrocruzamento foram então distribuídas para uso em programas de melhoramento. A resistência é conferida pelo gene dominante *Mi* (Gilbert & Mcguire, 1956), que é funcional para as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Ammati *et al.*, 1985 e Milligan *et al.*, 1998). Comparações na produção de tomate entre cultivares suscetíveis e resistentes (contendo o gene *Mi*) na presença e ausência de *Meloidogyne incognita* revelaram cerca de 50% de perdas na cultivar suscetível devido à infecção pelo nematóide (Roberts & May, 1986).

O gene *Mi* encontra-se em uma extensa região do genoma de tomate no braço curto do cromossomo 6 (Messeguer *et al.*, 1991). A proteína codificada pelo gene *Mi* contém 1257 aminoácidos e apresenta alta similaridade com outras proteínas que têm papel importante na resistência a outros patógenos. Este gene pertence à família de genes de resistência contendo NBS-LRR ('nucleotide-binding/leucine-rich repeat') (Milligan *et al.*, 1998), sendo que a maioria dos genes de resistência clonados até então, pertencem a esta família, que codifica proteínas tendo uma região conservada que contém o sítio NB e uma região LRR C-terminal (Ellis *et al.*, 2000). Genes desta classe conferem resistência a diversos patógenos incluindo vírus, bactérias, fungos e nematóides (Rossi *et al.*, 1998). Enquanto a região LRR é muito variável, a região NBS apresenta 'motivos conservados'.

Sabe-se que *Mi* confere ainda resistência ao afídeo da batata *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (Kaloshian *et al.*, 1995 e Rossi *et al.*, 1998) e aos biótipos B e Q de *Bemisia tabaci* (Nombela *et al.*, 2003).

Embora *Mi* seja efetivo, altas temperaturas podem interferir no efeito do gene. De acordo com Dropkin (1969), a resistência conferida pelo gene *Mi* foi parcialmente perdida em ambiente com temperatura acima de 28° C. Bost & Triantaphyllou (1982) também verificaram quebra de resistência por alguns isolados das espécies acima citadas. Este mecanismo permanece desconhecido, entretanto, hipóteses referem-se à instabilidade da proteína codificada pelo gene e/ou a inatividade do promotor. Chen *et al.* (2006) trabalhando com plantas transgênicas, substituíram o promotor nativo do gene *Mi* pelo promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) e obtiveram plantas com maior resistência em temperaturas mais elevadas, indicando que a instabilidade do promotor nativo é um dos fatores que afeta a quebra de resistência a altas temperaturas. Além disso, foi observado também um baixo nível de transcritos de *Mi*, associado à perda de resistência em plantas contendo várias cópias do gene, provavelmente, devido ao silenciamento gênico pós transcricional.

Outros genes/alelos foram relatados em outras cultivares (Sidhu & Webster, 1973) e também novas fontes de genes foram reportadas (Ammati *et al.*, 1985 e Roberts *et al.*, 1990). Veremis & Roberts (1996 a,b) e Roberts *et al.* (1998) demonstraram a existência de vários genes de resistência a espécies de *Meloidogyne* spp. presentes em *S. peruvianum*. Esses genes estão localizados nos cromossomos 6 e 12, ou em 'loci' não conhecidos, alguns sendo caracterizados por sua resistência à espécie *M. hapla* Chitwood, a temperatura alta e/ou aos isolados que quebram a resistência de *Mi*. Veremis *et al.* (1999) mapearam no cromossomo 6 um gene, cuja resistência apresenta-se estável a altas temperaturas. Amiraju *et al.* (2003) designaram este gene como *Mi-9* com base em diferenças moleculares, fenotípicas e de recombinação quando comparado a outros genes de resistência (Veremis & Roberts, 2000).

## **6. Marcadores Moleculares, marcadores baseados em análises de restrição de DNA e marcadores baseados na amplificação de DNA**

### **6.1. Marcadores Moleculares:**

Marcadores constituem importantes ferramentas para o melhoramento vegetal. Basicamente existem dois tipos de marcadores: os morfológicos e os moleculares (Tanksley, 1983). Marcadores morfológicos já foram amplamente utilizados, porém atualmente são de uso limitado. Marcadores moleculares são mais efetivos e podem oferecer polimorfismo alto por ‘locus’ estudado, enquanto marcadores morfológicos apresentam um baixo nível de polimorfismo (Kongkiatngam *et al.*, 1995).

Até meados da década de 60, os marcadores usados para os estudos genéticos e de melhoramento eram controlados por características morfológicas com fenótipos de fácil identificação como nanismo, deficiência de clorofila, cor das pétalas e morfologia foliar (Rick & Yoder, 1988). Este tipo de marcador contribuiu muito para estudos de ligação gênica e construção dos primeiros mapas genéticos, entretanto seu uso apresenta muitas limitações em programas de melhoramento devido ao pequeno número de marcadores morfológicos em uma mesma linhagem, dificultando assim, as chances de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e os genes de importância econômica. Esses caracteres, apesar de serem de fácil avaliação e baixo custo, são restritos a poucas espécies vegetais para as quais o número de informações genéticas é maior, por exemplo, para milho (*Zea mays* L.), tomate e ervilha (*Pisum sativum* L.) (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Além disso, estes marcadores podem também estar sujeitos a fatores ambientais, e com grande frequência são identificados apenas em nível da planta inteira ou adulta.

Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas e cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo cuja sequência e função, na maioria das vezes, são desconhecidas (Gostimsky *et al.*, 1999). Podem ser definidos ainda como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso como no caso dos marcadores isoenzimáticos, ou um segmento de DNA codificante ou não, no caso dos marcadores moleculares baseados em DNA. Marcadores moleculares de DNA correspondem a segmentos de DNA fisicamente ligado a ‘loci’ que determinam características de interesse.

Quando estes marcadores, tanto os morfológicos como os moleculares, se comportam de acordo com as leis básicas de hereditariedade eles são ditos ‘marcadores genéticos’ e seu comportamento pode ser verificado em uma população segregante.

Com o advento das técnicas modernas da biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético. Desta forma mapas genéticos desenvolvidos até então a partir de marcadores morfológicos e isoenzimáticos puderam ser saturados com o uso de marcadores moleculares. Citam-se como exemplos mapas genéticos para o milho (Helentjaris *et al.*, 1986), arroz (*Oryza sativa* L) (McCouch *et al.*, 1988), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Chao *et al.*, 1989) e tomate (Tanksley *et al.*, 1992). Outras espécies também tiveram mapas genéticos rapidamente desenvolvidos, como o eucalipto (*Eucalyptus* spp) (Grattapaglia & Sederoff, 1994) e o maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) (Carneiro *et al.*, 2002).

De acordo com a técnica utilizada, os marcadores moleculares podem ser baseados em análises de restrição ou amplificação de DNA. Na primeira categoria inclui-se a análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP - ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’). Para os marcadores obtidos por amplificação de DNA estão os marcadores do tipo SSR (‘Simple Sequence Repeat’), AFLP (‘Amplified Fragment Length Polymorphism’), RAPD (‘Random Amplified Polymorphic DNA’) e RGA (‘Resistance Gene Analogs’).

Marcadores moleculares apresentam, dentre outras, a grande vantagem de poderem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, desde que quantidades suficientes de DNA possam ser obtidas, permitindo assim acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejados, reduzindo o tempo necessário para completar uma geração e conseqüentemente, aumentando a eficiência de programas de melhoramento.

## **6.2. Marcadores baseados em análises de restrição de DNA**

### **6.2.1. RFLP (‘Restriction Fragment Length Polymorphism’)**

Marcadores tipo RFLP são amplamente utilizados visando a caracterização de germoplasmas, estudos filogenéticos e seleção e localização de genes específicos de características agrônômicas importantes.

O polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição é obtido mediante cortes da fita dupla de DNA com o uso de enzimas de restrição. Fragmentos distintos são gerados

para indivíduos que diferem entre si em relação à posição dos sítios de restrição. Em etapa posterior, estes fragmentos são hibridizados com sondas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência ou colorimetria.

Este tipo de marcador cobre bem o genoma e apresenta expressão co-dominante, entretanto é necessária a obtenção de uma biblioteca de sondas, extensa mão-de-obra, pessoal técnico especializado e instalações adequadas ao manuseio e descarte de material radioativo.

### **6.3. Marcadores baseados na amplificação de DNA**

#### **6.3.1. Microssatélites ('Simple Sequence Repeats')**

O genoma dos eucariotos apresenta diferentes classes de sequências repetidas. Estas repetições podem ser classificadas de acordo com a sua extensão em: satélites, minissatélites e microssatélites.

Descritos por Hamada *et al.* (1982), os microssatélites ou SSR ('Simple Sequence Repeats') consistem em uma sequência de DNA que contém nucleotídeos repetidos (1 a 6) e que se encontram distribuídos ao longo dos genomas de plantas e animais, podendo ou não estar associados a genes. Desta forma, os microssatélites podem ser classificados em mononucleotídicos, dinucleotídicos, trinucleotídicos, etc. Estes marcadores têm sido também utilizados para aplicações de mapeamento genético em inúmeras frutíferas (Kijas *et al.*, 1995 e Cipriani *et al.*, 1999).

Regiões contendo SSR são amplificadas através da PCR. Os amplicons quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada microssatélite, independente do elemento repetido (CA, TG, etc.), constitui um 'locus' genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo 'locus'.

Estes marcadores são co-dominantes e cobrem bem o genoma, porém requerem grande trabalho na obtenção de uma biblioteca de fragmentos genômicos pequenos. Necessitam ainda, de mão de obra especializada e equipamento sofisticado para sequenciamento automático, o que torna muito elevado o custo desta técnica.



### **6.3.2. AFLP ('Amplified Fragment Length Polymorphism')**

Desde o seu desenvolvimento e divulgação, esta técnica tem sido utilizada para construção de mapas genéticos, principalmente em plantas cultivadas que apresentam baixo polimorfismo (Grattapaglia & Ferreira, 1998).

AFLP baseia-se na rapidez e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR, combinada com a especificidade, a resolução e o poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição. Além de reproduzível, confiável e relativamente rápida, esta técnica gera um grande número de marcadores moleculares.

Para a análise de AFLP, o DNA genômico deve ser inicialmente clivado com duas enzimas de restrição, uma de corte raro (reconhecendo de 6-8 pb) e outra de corte frequente (reconhecendo 4 pb), porém, uma de cada vez. A seguir adaptadores específicos são ligados às extremidades dos fragmentos genômicos. Uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando 'primers' para os adaptadores. Por fim os fragmentos são separados em gel.

Estes marcadores são dominantes, e não exigem conhecimento prévio da sequência de DNA, entretanto a técnica para obtenção de AFLP, comparada às técnicas mencionadas aqui, é um pouco mais complicada e exige quantidades maiores de DNA e de melhor qualidade, porém é capaz de gerar grandes quantidades de fragmentos.

### **6.3.3. RAPD ('Random Amplified Polymorphic DNA')**

No início da década de 90 três grupos desenvolveram concomitante e independentemente variantes da técnica de PCR, denominando-as de AP-PCR (Arbitrarily Polymerase Chain Reaction; Welsh & McClelland, 1990), DAF (DNA Amplification Fingerprinting; Caetano-Anóles *et al.*, 1991) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams *et al.*, 1990), tendo esta última se tornado a mais popular das três (Lacerda *et al.*, 2002).

A técnica de RAPD utiliza 'primers' mais curtos (decâmeros) e de sequência arbitrária, eliminando a necessidade de conhecimento prévio da sequência. Tipicamente usa-se apenas um tipo de 'primer' em cada reação, sendo este normalmente formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com conteúdo de G + C entre 50 e

70% (Fritsch & Rieseberg, 1996). Desta forma, a reação de RAPD ocorre devido ao anelamento do 'primer' único em pontos próximos do genoma, delimitando a região que será amplificada (Welsh & McClelland, 1990 e Williams *et al.*, 1990).

A reprodutibilidade dos resultados requer otimização e estrito controle das condições da reação, considerados pontos chave, juntamente com a concentração de DNA, de cloreto de magnésio e da enzima DNA polimerase. Além disso, a temperatura de anelamento e a qualidade da agarose, também podem afetar o número de amplificações bem como a sua intensidade e separação (Gostmisky *et al.*, 1999). O uso de BSA pode ser adotado, principalmente quando o DNA obtido não é muito puro (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Marcadores RAPD são tipicamente dominantes e apresentam uma boa capacidade multiplex, identificando um bom número de 'loci' polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por 'locus' (dois alelos: amplificado e não-amplificado), entretanto é considerada uma técnica altamente acessível, por ser rápida e de baixo custo.

## OBJETIVOS

Considerando-se a grande importância de infecções causada por begomovírus na cultura do tomate e a necessidade de geração de genótipos com resistência ampla a esses patógenos, este trabalho visa dar suporte aos programas de melhoramento genético através da realização de estudos da interação begomovírus/tomate.

Assim, esta tese teve como objetivo geral estudar a expressão fenotípica e mecanismos de ação de genes envolvidos na resistência ampla a begomovírus monopartidos e bipartidos em tomate.

Os objetivos específicos foram:

1. Estudar o impacto da época de inoculação de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e do gene de resistência *Ty-1* em componentes de produção e qualidade de híbridos de tomate para processamento industrial.
2. Avaliar acessos selvagens de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) visando identificar resistência simultânea as espécies de *Meloidogyne* e espécies de begomovírus monopartidos e bipartidos.
3. Estudar a resistência de acessos de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) à *Bemisia tabaci* biótipo B.
4. Estudar mecanismos envolvidos na resistência ao *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL) e os efeitos da dispersão primária e secundária pelo vetor *Bemisia tabaci* biótipo Q.
5. Analisar determinantes de resistência presentes em 'TX-468-RG' à infecção causada por begomovírus monopartidos.
6. Identificar marcadores RAPD associados com a resistência a espécies de *Begomovirus* bipartidos em uma população F<sub>2</sub> proveniente do cruzamento de *Solanum lycopersicum* entre 'Ohio-8245' x 'TX-468-RG' (gene *tcm-1*).

## CAPÍTULO 2

### **Impacto da época de inoculação de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e do gene de resistência *Ty-1* em componentes de produção e qualidade de híbridos de tomate para processamento industrial**

Rita de Cássia Pereira-Carvalho<sup>1,2</sup>; Maria Esther de Noronha Fonseca<sup>1</sup>; Renato O. Resende<sup>2</sup>; Alice K. Inoue-Nagata<sup>1,3</sup>; João Bosco Carvalho da Silva<sup>1</sup> & Leonardo S. Boiteux<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970, Brasília-DF, Brasil; <sup>2</sup>UnB - Departamentos de Fitopatologia e de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília-DF, Brasil. <sup>3</sup>Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq/MCT.

## RESUMO

As empresas e produtores de tomate para processamento vêm conseguindo reduzir os danos devido à infecção por begomovírus através da adoção de técnicas de manejo, incluindo a produção de mudas em viveiros livres de insetos. Apesar deste esforço, epidemias e severas perdas de rendimento têm sido relatadas, especialmente em mudas de cultivares suscetíveis precocemente infectadas por estes vírus. O impacto da infecção por espécies de *Begomovirus* em componentes de produção e qualidade de híbridos de tomate industrial plantados em larga escala no Brasil ainda não é plenamente conhecido. O objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito da época de infecção de mudas por begomovírus na produtividade e qualidade dos frutos de diferentes híbridos para processamento e estimar o impacto da utilização do gene de resistência *Ty-1* nas condições do Brasil Central. A inoculação das mudas foi realizada em condições controladas em casa-de-vegetação, usando moscas-brancas (*Bemisia tabaci* biótipo B) virulíferas, em três épocas (22, 29 e 36 dias após semeadura). Foram avaliados os híbridos comerciais ‘H-9992’ (Heinz); ‘H-7155’ (Heinz); ‘U-2006’ (Unilever); ‘U-232’ (Unilever); ‘H-9553’ (Heinz), o híbrido experimental ‘HEI-036’ (com o gene *Ty-1*) e a cultivar ‘Tospodoro’ (controle suscetível). Plantas inoculadas e não-inoculadas de cada variedade foram simultaneamente transplantadas em campo. Os resultados da análise de sequência do DNA-A viral indicou a presença do isolado de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Foram observadas diferenças significativas em quase todas as variáveis avaliadas comparando-se as três épocas de inoculação com os controles não-inoculados. A média da produção de frutos das plantas não-inoculadas foi de 98,1 t/ha, enquanto a média dos tratamentos inoculados foi de 33,7 t/ha. As perdas na produtividade nos híbridos comerciais suscetíveis inoculados variaram de 69 a 78% quando comparado com os tratamentos não-inoculados. Diferenças foram observadas também no número e peso de frutos por planta e peso médio de frutos. Estes resultados mostram uma redução significativa de produtividade em mudas precocemente infectadas quando comparadas com mudas não infectadas ou infectadas apenas após o transplante. O híbrido experimental ‘HEI-036’ (heterozigoto *Ty-1/ty-1*) apresentou sintomas mais atenuados e produtividade mais elevada em condições de inoculação (82 t/ha vs. 29,9 t/ha do híbrido suscetível de melhor performance, ‘U-232’). No entanto, estes níveis de produtividade de ‘HEI-036’ foram inferiores aos observados em condições de não-inoculação (144 t/ha), indicando que o

'locus' *Ty-1* (em heterozigose) é eficiente em condições epidêmicas, mas não ao ponto de impedir reduções consideráveis de produtividade nas condições experimentais empregadas. Não foram observadas diferenças significativas no que se refere à época de inoculação para a maioria das variedades. Estes resultados indicam que mudas expostas a pressões elevadas de moscas-brancas virulíferas até os 36 dias após sementeira, podem sofrer perdas equivalentes de produtividade. Os resultados também confirmam a possibilidade de atenuar os prejuízos econômicos causados por infecções por espécies de *Begomovirus* via utilização de técnicas de manejo (produção e cultivo de mudas sob proteção de populações elevadas de moscas-brancas virulíferas) em combinação com cultivares resistentes (gene *Ty-1*).

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum*, *Bemisia tabaci*, *Begomovirus*.

### ABSTRACT

Growers and tomato processing industries are minimizing the economic losses due to infection by *Begomovirus* species via implementation of crop management strategies, including seedling production under insect-free plastic houses. Even with this effort, *Begomovirus* epidemics have been reported, especially in early-infected susceptible cultivars/hybrids. The impact of begomovirus infection on fruit yield and quality components of the currently cultivated hybrids in Brazil is still largely unknown. The main objective of the present work was to estimate the effect of the time of seedling infection by begomoviruses in yield and quality components in a group of processing tomato hybrids as well as the impact of the *Ty-1* resistance gene under Central Brazil conditions. Seedling inoculation was conducted under greenhouse conditions via viruliferous whiteflies (*Bemisia tabaci* biotype B) in three distinct stages/seedling ages (22, 29, and 36 days after sowing). The following commercial hybrids were evaluated 'H-9992' (Heinz); 'H-7155' (Heinz); 'U-2006' (Unilever); 'U-232' (Unilever) and 'H-9553' (Heinz). The experimental hybrid 'HEI-036' (carrying the *Ty-1* gene in heterozygous condition) and the cultivar 'Tospodoro' (susceptible control) were also included in this experiment. Inoculated and non-inoculated seedlings were transplanted into the field at the same day. Sequence analysis confirmed that an isolate of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) was the inoculum source. Significant differences between inoculated and non-inoculated groups of plants were observed in all but

one component. The average yield of the non-inoculated plants (in all stages) was 98.1 t/ha, whereas the average yield in the group of inoculated plants was 33.7 t/ha. Yield losses in the susceptible hybrids ranged from 69 to 78%. Statistical differences were also observed for the number of fruits per plant and yield per plant as well as average fruit weight. The experimental hybrid 'HEI-036' (*Ty-1/ty-1*) displayed very mild symptoms and the highest fruit yield under both inoculated (82 t/ha) and non-inoculated conditions (144 t/ha). The susceptible hybrid with the best performance under inoculated conditions was 'U-232' with 29.9 t/ha. These results indicated that the 'locus' *Ty-1* (in heterozygous condition) is efficient under high inoculum pressure, but it was unable to avoid yield losses in the employed experimental conditions. No differences were observed in an overall analysis in relation to the effects of the seedling stage on the majority of the yield and quality components. Therefore, the implementation of combined management strategies such as seedling production free of strong pressure of viruliferous whiteflies and the use of resistant cultivars with the *Ty-1* 'locus' might minimize the economic losses caused by begomovirus infection.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, *Bemisia tabaci*, *Begomovirus*.

## INTRODUÇÃO

O tomateiro [*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.] (Peralta *et al.*, 2005) é uma das hortaliças mais importantes no Brasil tanto em área cultivada como pela importância sócio-econômica. A cadeia agro-industrial brasileira de tomate para processamento industrial é, atualmente, eficiente e competitiva (Melo & Vilela, 2005). A incorporação vigorosa de avanços tecnológicos tem mantido a produtividade média próxima a 80 t/ha. Em 2005, a produção brasileira de tomate para processamento alcançou 1,24 milhões de toneladas, em uma área de 16 mil hectares (produtividade 77,5 t/ha). A produção em 2006 foi de 1.160.000 toneladas em uma área de 14,9 mil hectares (produtividade 77,8 t/ha) (Melo *et al.*, 2008). A partir de 1997, o Cerrado brasileiro consolidou sua liderança em termos de área plantada e produtividade. Durante o período de 1990/1996 foram plantados, nessa região, cerca de 5.800 hectares/ano. A safra de 1997 foi quase o dobro da verificada no ano anterior (9.300 ha) e permaneceu no patamar superior aos 10.000 ha após 1999. O

incremento de áreas de cultivo na região Central do Brasil também modificou o perfil dos produtores de tomate industrial no Brasil. As lavouras do Cerrado brasileiro são, em sua quase totalidade, de grande porte e administradas por produtores com estrutura empresarial e com forte adoção de tecnologia e providos de assistência técnica fornecida pelas agroindústrias. O resultado disto foi o aumento do número de lavouras atingindo níveis de produtividade acima de 120 t/ha de tomate na região (Melo *et al.*, 2008).

No entanto, epidemias causadas por espécies de *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) têm ocasionado perdas econômicas no agronegócio de tomate para processamento no Brasil (Giordano *et al.*, 2005a). De fato, ‘begomoviroses’ estão entre os principais problemas econômicos da cultura do tomateiro, em basicamente, todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Varma & Malathi, 2003 e Seal *et al.*, 2006). Estas doenças são transmitidas por diferentes biótipos de mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genn.) e apresentam quadro sintomatológico muito variado. No Brasil, epidemias de begomovírus foram detectadas pela primeira vez na região de Brasília-DF em 1994 (Ribeiro *et al.*, 1994). Nos anos seguintes, observou-se aumento na incidência e perdas de produção causadas por este grupo de vírus em outras regiões produtoras. A presença de begomovírus foi posteriormente observada infectando tomateiros nos Estados de Minas Gerais (Zerbini *et al.*, 1996), São Paulo (Faria *et al.*, 1997) e em outros Estados produtores de tomate do Nordeste (Bezerra *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1996 e Faria *et al.*, 2000). Concomitantemente, novos relatos de doenças do tipo ‘mosaico dourado’ e ‘mosaico rugoso’ passaram a se intensificar no país (Ribeiro *et al.*, 1998; 2003).

O aumento da incidência e severidade das doenças causadas por espécies de *Begomovirus* nas últimas décadas pode ser explicado pela introdução no País na década de 1990 de um novo biótipo do vetor (*B. tabaci* biótipo B = *B. argentifolii* Bellows & Perring) (França *et al.*, 1996). Este biótipo apresentou grande adaptação no País, resultando em rápido incremento populacional. Os hábitos alimentares polípagos do biótipo B favoreceram sua ampla dispersão geográfica com registro de severas infestações em todo o país. Foi também observado, simultaneamente com a disseminação de *B. tabaci* biótipo B, um aumento na diversidade de espécies do gênero *Begomovirus* capazes de infectar tomateiro no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2003). Um complexo de cerca de uma dezena de espécies de *Begomovirus* foi caracterizado via sequenciamento de segmentos de genomas de isolados



virais coletados nas principais regiões produtoras de tomate no Brasil. Novas espécies foram propostas, dentre as quais *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Galvão *et al.*, 2003), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2006) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegário *et al.*, 2006).

Em tomate para processamento industrial, ensaios utilizando inoculação controlada indicaram perdas de até 60% (Giordano *et al.*, 2005a). No entanto, ainda são escassos os ensaios para estimar a resposta à infecção por begomovírus nos principais híbridos utilizados pela indústria de processamento no Brasil.

De acordo com as informações obtidas junto às empresas processadoras, alguns dos híbridos que lideraram o cultivo na safra de tomate para processamento em 2003/2004 foram: ‘H-9992’ (Heinz, 5523 ha); ‘AP 533’ (Seminis, 1585 ha); ‘H-9665’ (Heinz, 1473 ha); ‘AP 529’ (Seminis, 1445 ha); ‘H-9553’ (Heinz, 1240 ha); ‘Hypeel 108’ (Seminis, 1040 ha); ‘Hycolor 312’ (Petoseed) e ‘RTP 1095’ (Novartis) com 980 ha cada uma. Na safra 2007/2008, os híbridos líderes de mercado foram ‘H-9992’ (Heinz, 2401 ha); ‘H-9553’ (Heinz, 2145 ha); ‘AP-529’ (Seminis, 2118 ha); ‘H-9889’ (Heinz, 1341 ha) e ‘Hypeel 108’ (Seminis, 1097 ha) e H-7155’ (Heinz, 551 ha). Em 2007, os híbridos ‘U-2006’ (Unilever), ‘U-232’ (Unilever) e ‘UG-8169’ (Agristar) também foram cultivados em diferentes regiões do Estado de Goiás. Todos estes híbridos listados são suscetíveis à infecção pelas diferentes espécies de *Begomovirus* bipartidos descritas no Brasil.

Nos últimos anos, os produtores e as empresas processadoras de tomate do Brasil Central estão conseguindo reduzir os danos devido à infecção por begomovírus através da adoção de técnicas de manejo da cultura que incluem a produção de mudas em viveiros isolados de campos de produção de tomate e a escolha de idades das mudas mais adequadas para o transplântio em condições de campo. No entanto, apesar de todos os cuidados, epidemias severas de begomovírus ainda têm sido relatadas especialmente em mudas de cultivares suscetíveis precocemente infectadas. Neste contexto, a mais eficiente e econômica opção para controle de ‘begomovirose’ consiste no uso de cultivares/híbridos apresentando fatores de resistência. Fontes de resistência efetivas contra as espécies de *Begomovirus* (gene *tcm-1*) que estão ocorrendo no Brasil foram detectadas (Santana *et al.*, 2001 e Giordano *et al.*, 2005b) e os primeiros híbridos de tomate para consumo *in natura* com resistência a begomovírus devido a presença do gene *Ty-1* (Zamir *et al.*, 1994) foram colocados no

mercado (Boiteux *et al.*, 2007). No entanto, híbridos de tomate para processamento industrial com resistência a begomovírus ainda não estão sendo plantados em grande escala no Brasil.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o impacto da época de infecção por espécies de *Begomovirus* em componentes de produção e qualidade de híbridos de tomate industrial plantados em larga escala no Brasil. Além disso, um híbrido experimental foi incluído neste experimento visando comparar a eficiência do ‘locus’ *Ty-1* em reduzir perdas por begomovírus em tomate para processamento industrial nas condições do Brasil Central.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Local do ensaio e acessos de tomate industrial avaliados:** O presente trabalho foi conduzido em casa-de-vegetação (nos meses de maio a junho de 2007) e no campo experimental da Embrapa Hortaliças, em Brasília-DF, durante os meses de junho a outubro de 2007. Cinco dos principais híbridos de tomate para processamento plantados no Brasil Central foram utilizados no presente ensaio: ‘H-9992’ (Heinz); ‘H-7155’ (Heinz); ‘U-2006’ (Unilever); ‘U-232’ (Unilever) e ‘H-9553’ (Heinz). O híbrido experimental do CNPH ‘HEI-036’ (contendo o gene *Ty-1* que confere resistência a begomovírus) e a cultivar ‘Tosporo’ foram também incluídos no ensaio. ‘Tosporo’ é uma isolinha (diferindo pela presença do gene *Pto*) da cultivar ‘Viradoro’ (Giordano *et al.*, 2000), sendo ambas suscetíveis a espécies de *Begomovirus* (Giordano *et al.*, 2005a).

**Inoculação de plântulas de tomate via moscas-brancas virulíferas em condições de casa-de-vegetação:** A inoculação controlada de begomovírus foi realizada em casa-de-vegetação usando moscas-brancas (*B. tabaci* biótipo B) virulíferas em mudas com diferentes estádios ou épocas (22, 29, 36 dias após semeadura, aqui denominadas de épocas 1, 2 e 3, respectivamente). Os sete acessos de tomateiro industrial foram semeados em réplicas em bandejas de isopor de 72 células (duas bandejas por cada material) contendo substrato Plantmax, em três épocas diferentes. Vinte e dois dias após a última semeadura, as bandejas (ou seja, réplicas de cada material em cada época de semeadura) foram levadas, simultaneamente, para casa-de-vegetação contendo moscas-brancas virulíferas. Estas moscas foram obtidas de colônias mantidas em plantas de tomate infectadas com um isolado

de begomovírus coletado na região de Brasília. As plantas mantidas em bandejas de isopor e que foram inoculadas (mediante alta pressão de inóculo) formaram o grupo inoculado (I). O grupo de mudas não-inoculadas (NI) dos estádios ou épocas (22, 29 e 36 dias após semeadura) foi mantido em casa-de-vegetação livre de moscas-brancas virulíferas. As plantas inoculadas permaneceram nas casas de vegetação durante sete dias, quando então as moscas-brancas foram eliminadas pela aplicação de Imidacloprid. Durante este tempo, a réplica não-inoculada foi mantida em casa-de-vegetação livre de moscas-brancas. Após sete dias, o grupo de plantas não-inoculadas foi também pulverizado com inseticida visando à padronização dos tratamentos.

**Transplante em condições de campo e delineamento experimental:** Após tratamento com Imidacloprid, as plantas (inoculadas e não-inoculadas) de cada híbrido nas três épocas (22, 29 e 36 dias após semeadura) foram simultaneamente transplantadas para campo. O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso (DBC), com três repetições, espaçamento de 1,0 m entre linhas e 0,3 m entre plantas e 16-20 plantas por parcela.

**Avaliação para resposta à infecção por begomovírus:** Quarenta dias após o transplante a infecção foi estimada visualmente por meio do índice de severidade da doença, utilizando-se a seguinte escala de notas: 1 = ausência de sintomas 2 = amarelecimento e mosaico dos folíolos 3 = mosaico, enrugamento dos folíolos, clorose internerval e epinastia e, 4 = mosaico, enrugamento severo e nanismo.

**Identificação da espécie viral empregada como inóculo:** Foram coletadas amostras foliares dentro das parcelas inoculadas (em condições de casa-de-vegetação) e também dentro dos grupos de plantas não-inoculados. O DNA total foi extraído de cada planta usando uma modificação do método de CTAB (Boiteux *et al.*, 1999). Um segmento do DNA-A viral foi seletivamente amplificado via PCR utilizando os ‘primers’ degenerados: ‘PAL1v1978’ (5’-GCATCTGCAGGCCCAACTYGTCTTTYCCNGT-3’) e ‘PARc715’ (5’-GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA-3’), desenvolvidos para detecção de diferentes espécies de *Begomovirus* (Rojas *et al.*, 1993). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 12,5 µL contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, 250 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP,

dCTP), 0,8  $\mu$ M de cada 'primer', uma unidade da enzima Taq polimerase e 30 ng de DNA. As ampliações foram efetuadas em termociclador (Gene AmpR PCR System 9700) programado para um ciclo de 94° C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 30 segundos a 94° C, 60 segundos a 50° C e 3 minutos a 72° C, seguido de extensão final de 7 minutos a 72° C e finalmente a temperatura foi reduzida para 4° C. Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos obtidos com a PCR indicou a presença de um único amplicon com cerca 1300 pares de bases. Uma alíquota do produto da PCR foi diretamente sequenciada (em ambas as direções) usando o kit Big-DyeIII® em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), do Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças. Análise da sequência foi feita empregando o algoritmo BlastN ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) e as sequências foram alinhadas pelo método Clustal W dentro do aplicativo computacional LaserGene (Madison, WI).

**Análise dos componentes de produtividade:** Os componentes de produção avaliados foram os seguintes: NFV = número de frutos verdes por planta; NFM = número de frutos maduros por planta; NTF = número total de frutos por planta; PFV = peso de frutos verdes (kg) por planta; PFM = peso de frutos maduros (kg) por planta; PTF = peso total de frutos (kg) por planta; PFP = peso fresco da planta na colheita (kg); t/ha= produção total da parcela convertida para produção por hectare e PMeF = Peso médio de frutos (g). A coleta de dados dos componentes de produtividade foi realizada de maneira sincronizada, de acordo com a idade das plantas a partir da data de semeadura. Neste sistema, as parcelas dos acessos (inoculados e não-inoculados) correspondentes à época 3 (idade de 36 dias) foram as primeiras a serem colhidas, seguidas pelas colheitas das épocas 2 e 1 (29 e 22 dias, respectivamente). Desta forma, foi escolhida a data da semeadura nas bandejas como referência para o início da colheita. No momento do transplante observavam-se facilmente as diferenças de idades entre as plantas, entretanto depois de alguns dias estas diferenças tornaram-se menos perceptíveis e observou-se uma tendência das plantas atenuarem as diferenças entre os acessos de cada época em termos de porte e desenvolvimento fenológico. A primeira colheita foi realizada aos 104 dias após o transplante, seguida de outras duas colheitas (uma e duas semanas de diferença da primeira colheita). Plantas afetadas por outros patógenos foram eliminadas no momento da colheita.

**Análise dos componentes de qualidade dos frutos: (1) viscosidade (vis):** Este é um importante atributo para a produção de 'ketchup'. Amostras, contendo 1,3 kg de frutos, foram colocadas em um forno de microondas (frequência de 2450 megaciclos e potência de entrada 950 W) por 12 minutos visando à inativação de enzimas. Após este período de permanência no forno de microondas, as amostras foram novamente pesadas, sendo restabelecido o peso original utilizando-se água destilada. As amostras foram trituradas utilizando-se um multiprocessador (National MJC 13) sendo a polpa passada em peneira com orifício de 0,8 mm de diâmetro. Em seguida procedeu-se à retirada de ar das amostras utilizando-se uma bomba de vácuo por cerca de 2 minutos. Na determinação da viscosidade utilizou-se o viscosímetro de Bostwick medindo-se (em cm) o escorrimento da polpa (a 25°C por 30 segundos); **(2) teor de sólidos solúveis (°Brix):** foi estimado usando um refratômetro digital (modelo ATAGO), sendo utilizados 10 frutos de uma amostra de 3 kg de frutos por parcela e **(3) acidez titulável (AT):** foi determinada conforme metodologia padrão (Pregnotatto & Pregnotatto, 1985) utilizando-se a fórmula  $AT = [V \times N \times E] / [10 \times M]$ . Onde: AT = acidez titulável; V = volume (em mL) da solução de NaOH consumido para atingir pH de 8,1; N = normalidade da solução de NaOH; E = equivalente-grama do ácido predominante (64,02 g para ácido cítrico) e M = massa da amostra utilizada (g).

**Análise dos dados:** Os valores para níveis de infecção viral e para todos os componentes de produção e qualidade foram computados. Foram enfatizados os contrastes entre grupos de exposição ao vírus (plantas inoculadas vs. não-inoculadas), épocas de inoculação, híbridos e interações híbridos/grupo de exposição ao vírus/épocas de inoculação e a presença/ausência do gene de resistência *Ty-1*. Procedeu-se a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o aplicativo computacional '*SAS/STAT Guide for Personal Computers*' (versão 6, SAS Institute, Cary-NC, 1987) As médias das características avaliadas foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de sequência de nucleotídeos indicou que o vírus utilizado como fonte de inóculo no presente ensaio é um isolado da espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) tanto nas amostras obtidas de inoculações controladas em casa-de-vegetação, quanto nas amostras obtidas de plantas mostrando sintomas de infecção por begomovírus em condições

de campo. A avaliação para severidade de sintomas de ToSRV foi feita aos 40 dias após o transplante. Todas as plantas inoculadas do controle suscetível ‘Tospodoro’ apresentaram sintomas característicos de infecção por begomovírus incluindo enrugamento foliar severo, clorose internerval, epinastia e redução severa no crescimento da planta. Estes resultados comprovaram a eficiência do método de inoculação em casa-de-vegetação usando moscas-brancas virulíferas.

Não foram observadas diferenças significativas quanto à intensidade de sintomas para as três épocas (22, 29 e 36 dias após semeadura), no grupo de plantas inoculadas (I) quando comparadas ao grupo de plantas não-inoculadas (NI) (Tabela 1). Do ponto de vista do melhoramento genético e do manejo da doença, este resultado indica que, em condições de elevada pressão de inóculo (moscas-brancas virulíferas), a idade da muda quando inoculada (entre 22-36 dias) não é tão importante em termos da manifestação ou intensidade de sintomas. Na avaliação para a reação a ToSRV, a maioria das plantas do grupo NI apresentava ausência de sintomas com apenas algumas plantas exibindo sinais de infecção, muito provavelmente ocorrida posteriormente ao transplante em condições de campo. Além disso, foi observado ainda um número reduzido de plantas com intensidade de sintomas severos (médias entre 3,0 e 3,5), indicando que a pressão de inóculo natural de ToSRV no campo estava baixa. A ausência de fontes externas de vírus em condições de campo sugere que a principal fonte de inóculo foram as plantas das parcelas inoculadas. A média geral para o índice de severidade da doença no grupo de plantas NI foi de 1,3 (variando de 1,2 a 1,5). O grupo de híbridos suscetíveis inoculados antes do transplante em campo apresentou médias de sintomas variando de 3,2 a 3,8. Todos os contrastes entre grupos de plantas I e NI (para cada acesso) foram significativos, indicando que adoção de um manejo que evite a exposição das mudas a pressões de inóculo elevadas pode resultar em significativas reduções nas intensidades dos sintomas devido à infecção por espécies de *Begomovirus*.

O híbrido experimental ‘HEI-036’ (heterozigoto *Ty-1/ty-1*) apresentou sintomas mais atenuados quando comparado com os híbridos suscetíveis (Tabela 1). O fenótipo que melhor descreve a resposta de ‘HEI-036’ é o de ‘resistência parcial’ (*sensu* Parlevliet, 1979) ou ‘tolerância’ (*sensu* Cooper & Jones, 1983), uma vez que o tratamento I (inoculado) mostrou sintomas suaves do vírus e foi estatisticamente diferente do tratamento NI (média de severidade de doença de 1,9 e 1,2 respectivamente). Resultado semelhante foi observado em

híbridos experimentais heterozigóticos para *Ty-1* avaliados em Minas Gerais, que apresentaram sintomas intermediários quando comparados com linhagens homozigóticas resistentes (*Ty-1/Ty-1*) e linhagens homozigóticas suscetíveis (*ty-1/ty-1*) (Nízio *et al.*, 2008). Os acessos heterozigóticos, cujas notas variaram de 2 a 3 (em uma escala de 1-5), responderam à infecção de modo semelhante a outros genótipos heterozigotos para o ‘locus’ *Ty-1*, conforme observado anteriormente por Boiteux *et al.* (2007).

A produtividade é a principal característica agrônômica considerada ao avaliar o desempenho de cultivares e híbridos de tomate. Desta forma, é de extremo interesse estimar as perdas de produtividade devido à infecção por espécies de begomovírus. A produtividade pode ser subdividida em diversos componentes de produção. Além disso, as cultivares destinadas ao processamento devem também apresentar outras características agrônômicas e de qualidade incluindo, por exemplo, precocidade, maturação concentrada dos frutos, aspecto externo do fruto como forma e homogeneidade da cor, teor de sólidos solúveis, viscosidade, resistência à manipulação e ao transporte a granel. No presente trabalho, o efeito da infecção por begomovírus foi analisado em 12 componentes de produção e qualidade. A Tabela 2 apresenta a análise global do efeito da infecção por begomovírus nos componentes de produção e qualidade avaliados.

A comparação entre média geral do grupo NI e média geral do grupo I indica diferenças significativas para a maioria dos componentes analisados. A única exceção foi a característica viscosidade dos frutos. Diferenças significativas foram observadas para produção total, sendo a média do grupo NI igual a 98,1 t/ha e a do grupo I de 33,7 t/ha, representando assim, em termos gerais, uma redução de 66% na produtividade. Não houve diferenças significativas na avaliação global para a maioria dos acessos de tomate quanto às diferentes épocas avaliadas. No entanto, foram observadas diferenças significativas entre as épocas de inoculação quando se analisou cada cultivar/híbrido individualmente. Estas diferenças foram observadas para os seguintes componentes: número de frutos verdes (NFV) e maduros (NFM) e peso de frutos verdes (PFV) e maduros (PFM) tanto para o grupo não-inoculado como para o grupo inoculado. Não foram observadas, entretanto, diferenças significativas entre as épocas quanto ao número total de frutos (NTF), peso total de frutos (PTF) e peso médio de frutos (PMeF) para os dois grupos de exposição ao vírus (não-inoculado e inoculado). No grupo NI observaram-se diferenças significativas para peso

fresco da planta (PFP) e AT, sendo obtidos valores maiores na época 3. Nos componentes produtividade (t/ha) e viscosidade, os valores foram menores para a época 3. No grupo I não foram observadas diferenças nas três épocas avaliadas para PFP, produtividade, PMeF e viscosidade (Tabela 2). É interessante salientar que para características de Brix e AT, os valores obtidos no grupo de plantas inoculadas foram significativamente maiores que os obtidos no grupo de plantas não-inoculadas. A análise comparativa entre os grupos de plantas I vs. NI para os principais componentes de produção se encontra ilustrada nas Figuras 1 e 2.

O comportamento dos sete híbridos de tomate avaliados para reação ao ToSRV em idades diferentes (a partir de 22, 29 e 36 dias após semeadura) quanto a NFV, NFM, NTF encontra-se na Tabela 3. No grupo NI os acessos ‘H-9553’, ‘U-2006’, ‘U-232’ ‘HEI-036’ e ‘Tospodoro’ apresentaram diferenças significativas para as épocas avaliadas quanto a NFV ou NFM, entretanto o NTF permaneceu igual estatisticamente, sendo a exceção o híbrido ‘H-9553’. Não foram observadas diferenças para a maioria dos híbridos nas épocas avaliadas dentro do grupo de plantas inoculadas, exceto para NFV e NFM de ‘HEI-036’. No entanto, o componente NTF neste híbrido não foi diferente estatisticamente entre as épocas avaliadas. O controle suscetível ‘Tospodoro’ também apresentou diferenças estatísticas significativas para NFM (menor na época 1) e NTF (maior para a época 3). Diferenças estatísticas significativas foram observadas para NTF quando se comparou entre os híbridos comerciais e o híbrido ‘HEI-036’ tanto para plantas originárias de mudas inoculadas em casa-de-vegetação quanto àquelas que foram infectadas naturalmente em campo (Tabela 3). Observou-se que ‘HEI-036’ diferiu estatisticamente dos demais híbridos e controle por apresentar maior NTF em condições de inoculação precoce e tardia, embora este número tenha sido menor na infecção tardia (Tabela 3). Estes dados estão de acordo com Giordano *et al.* (2005a) que também verificaram uma acentuada redução no número de frutos por planta em infecção precoce. Assim, tal resposta à infecção viral reforça a importância de estudos adicionais para demonstrar se ela está associada com a redução do número de flores ou por uma maior incidência de frutos abortados, ou ainda ambos os fatores combinados.

O comportamento dos híbridos de tomate com relação aos componentes PFV, PFM, PFT e PFP nas distintas épocas de inoculação encontra-se na Tabela 4. Diferenças estatísticas significativas foram encontradas para PFP em ‘U-2006’ e ‘Tospodoro’, sendo



observados maiores valores para a época 3 em condições mais tardias. Foram observadas diferenças significativas quanto a PFV e PFM para ‘H-9992’, ‘H-9553’, ‘U-232’, ‘U-2006’ e ‘Tospodoro’ e ‘HEI-036’, embora apenas em ‘H-9553’ o PTF foi diferente estatisticamente (menor na época 3). Para os tratamentos inoculados foram observadas diferenças estatísticas em ‘U-232’ (em PFM), ‘Tospodoro’ (PTF) e ‘HEI-036’ (PFV, PFM, PTF). Observou-se uma diminuição na variável PTF de todos os híbridos inoculados e os controles não inoculados, entretanto, em ‘HEI-036’, diferente estatisticamente dos demais, esta diferença foi menos acentuada (36,2%), enquanto nos outros híbridos observaram-se perdas em peso de 73 a 81% (Tabela 4).

Os dados coletados mostraram um maior número de frutos verdes para quase todos os híbridos na época 3, tanto no grupo não inoculado quanto no grupo inoculado. A única exceção foi o híbrido ‘U-232’, embora os demais não tenham diferido estatisticamente. O mesmo foi observado para valores de peso de frutos verdes, maiores na época 3 (Tabelas 3 e 4). Por outro lado, os valores de números de frutos maduros, bem como o peso de frutos maduros em condições de não inoculado foram menores na época 3, à exceção de ‘Tospodoro’ que apresentou menores valores para a época 1. Com relação à inoculação precoce, a cultivar ‘Tospodoro’ apresentou um menor número de frutos maduros e menores valores para peso de frutos maduros na época 1, enquanto os híbridos ‘H-7155’ e ‘U-232’ apresentaram os mesmos valores de PFM nas épocas 1 e 3. (Tabelas 3 e 4). A tendência de maiores NFV e PFV e menores valores de NFM e PFM na época 3, pode indicar uma diferença de precocidade (maturidade) e na capacidade genética de concentrar a maturação de frutos uma vez que estas diferenças foram bem menos acentuadas para a cultivar suscetível ‘Tospodoro’. Outro fator importante se refere à idade em que o transplante foi realizado. A idade da muda transplantada pode, em alguns acessos, interferir no ciclo da cultura e na capacidade de concentrar a maturação de frutos. Plantas cultivadas em bandejas por mais tempo (neste caso as plantas aqui denominadas de época 3) podem se tornar mais vulneráveis a eventuais quebras de raízes (quando da remoção das mudas no momento do transplante) e resultar em certo atraso no desenvolvimento.

Foram observadas diferenças significativas em plantas NI nas diferentes épocas para os híbridos ‘H-7155’, ‘H-9553’, ‘U-232’ e a cultivar suscetível ‘Tospodoro’ quando foram considerados outros componentes de produção tais como produtividade (t/ha) e componentes

de qualidade tais como viscosidade e AT (Tabela 5). No grupo de plantas inoculadas (I), as diferenças foram observadas em algumas variáveis para ‘H-9553’, ‘H-9992’, ‘HEI-036’ e ‘Tospodoro’. Para características de Brix os maiores valores foram obtidos com ‘H-9992’ e ‘U-2006’ e no grupo NI novamente o ‘U-2006’. O maior rendimento (t/ha) no grupo NI foi observado no híbrido ‘HEI-036’, seguido de ‘H-9553’. O híbrido experimental ‘HEI-036’, seguido de ‘U-232’ foram os mais produtivos dentro do grupo de plantas inoculadas. A análise comparativa do efeito da inoculação de ToSRV no componente produtividade dos híbridos e da cv Tospodoro encontra-se ilustrada na Figura 3. Nesta figura pode-se observar o impacto positivo do ‘locus’ *Ty-1* na produção quando a comparação é feita dentro do grupo de plantas inoculadas.

Analisando os resultados obtidos para todos os acessos e os componentes avaliados e as três idades (épocas) das mudas, observa-se que, salvo raras exceções, não foram detectadas diferenças significativas entre as três épocas avaliadas. Houve uma tendência da produtividade ser maior nos acessos inoculados na época 3, exceto para ‘HEI-036’ e ‘Tospodoro’. No entanto, nas condições de realização do presente ensaio, estes valores não foram estatisticamente diferentes. O híbrido ‘H-9553’ foi peculiar no sentido de apresentar diferenças estatísticas para muitos dos componentes dentro das idades diferentes de inoculação/transplante, sendo que no grupo não-inoculado, a época 1 se destacou para variáveis como produtividade, NTF e PTF. No grupo inoculado, as diferenças significativas foram restritas a AT (que foi maior na época 3). Para ‘H-9553’ em condições de inoculado, embora não tenham sido observadas diferenças significativas, a época 2 apresentou produtividade de 24,5 t/ha e as épocas 1 e 3 de 20,7 e 20,2 t/ha, respectivamente. Para o ‘H-9992’ (em condições de não inoculação) se observou diferenças significativas apenas para PFV, sendo este, maior na época 3. Em condições de inoculado, diferenças estatísticas foram observadas para AT e Brix (maiores nas épocas 3 e 2 respectivamente). Embora não tenham sido diferentes estatisticamente, em inoculação precoce, a produtividade foi de 26 t/ha na época 3 e 23,03 e 24,43 t/ha nas épocas 2 e 1, respectivamente, assim como o PMeF de 37,0 g na época 3 e 36,1 e 25,4 g para as épocas 2 e 1. Em condições de inoculação tardia o híbrido ‘U-2006’ apresentou diferenças significativas somente quanto a PFP e NFV. Quando inoculado precocemente este híbrido não apresentou diferenças estatísticas para nenhuma das variáveis avaliadas, embora sua produtividade tenha sido ligeiramente maior na época 1.

Para plantas não-inoculadas de ‘U-232’, foram observadas diferenças significativas para AT, NFV, NFM, PFV e PFM não interferindo, entretanto, no NTF e PTF. Quando inoculadas, plantas deste híbrido mostraram diferenças apenas para PFM. Para o híbrido ‘HEI-036’, em condições de não inoculado, observou-se diferenças para NFV e NFM, PFV e PFM (não interferindo, entretanto no NTF e PTF). Quando inoculado, as diferenças significativas foram para produtividade, NFM, PFV, PFM e PTF. Para condições de não inoculado a cultivar ‘Tospodoro’ mostrou diferenças para as variáveis NFV, PFV, PFP e AT, entretanto em condições de plantas inoculadas precocemente verificou-se diferenças significativas nas três épocas avaliadas quanto à produtividade, NFM, NTF, PTF e AT, sendo maiores para época 3.

Quanto às características do fruto, sabe-se que o seu sabor é determinado pela quantidade de sólidos, principalmente açúcares e ácidos orgânicos e os compostos voláteis. Em torno de 95% da constituição do fruto maduro corresponde à água e apenas uma pequena quantidade de sua matéria sólida determina a sua qualidade (Giordano *et al.*, 2000). Nos 5% a 7% restantes, encontram-se compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares e outros compostos. A porcentagem de sólidos solúveis (representada pelo Brix) inclui os açúcares e os ácidos e tem influência sobre o rendimento industrial, enquanto a acidez titulável (AT) representada pelo teor de ácido cítrico influencia principalmente, o sabor dos frutos (Giordano *et al.*, 2000). Para características de fruto como Brix, AT e viscosidade, os maiores valores em condições de não inoculados foram obtidos com ‘H-9992’, ‘U-2006’ e ‘Tospodoro’, respectivamente, e em condições de inoculados destacaram-se ‘U-2006’, ‘U-232’ e ‘Tospodoro’ (Tabela 5). Estes valores de Brix se encontraram em uma faixa variando de 5,3 a 6,1 no grupo não inoculado. Estes valores se mostraram um pouco superiores aos normalmente obtidos com os mesmos híbridos em condições comerciais (entre 4,5 e 5,5). De acordo com Giordano *et al.* (2000) valores de Brix entre 3,9 e 5,0 com média em torno de 4,5 são considerados baixos, uma vez que para cada aumento de grau Brix na matéria prima há um incremento de 20% no rendimento industrial.

Este resultado pode ser explicado por algum tipo diferente de manejo e/ou componente ambiental na área onde foi conduzido o experimento. No grupo inoculado, os valores de Brix foram, em média, mais elevados que os observados no grupo não-inoculado

e variaram entre 5,8 e 6,8. Estes resultados indicam um efeito de compensação, especialmente devido ao reduzido número de frutos por planta no grupo inoculado.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam uma significativa redução de produtividade em mudas precocemente infectadas comparadas às mudas infectadas apenas após transplantio. Desta forma, existe a possibilidade de reduzir, por meio de técnicas de manejo do sistema de produção, os prejuízos econômicos causados por espécies de *Begomovirus*. Este manejo incluiria a opção preferencial pelo sistema de transplantio (ao invés de semeadura direta a campo), o isolamento físico de sementeiras e a escolha de idade das mudas mais adequadas para transplantio. Estes resultados também salientam a importância epidemiológica de se retardar ao máximo o processo de infecção por begomovírus em mudas de tomateiro implementando um controle apropriado dos vetores e eliminação de fontes de inóculo, principalmente constituídas por plantas de tomateiro previamente infectadas.

Tem sido demonstrado que a mais eficiente e econômica opção para o controle de ‘begomovirose’ consiste no uso de cultivares/híbridos apresentando resistência. No presente trabalho, estudou-se o comportamento de cinco híbridos comerciais de tomate para indústria amplamente cultivados no Brasil Central e o híbrido ‘HEI-036’ (com o gene *Ty-1* em heterozigose) em diferentes épocas de infecção por begomovírus em comparação com plantas não inoculadas antes do transplantio. Os resultados apresentados aqui mostram que o híbrido ‘HEI-036’ é promissor em termos de níveis de resistência ao ToSRV e potencial produtivo. Além disso, os dados indicaram que ‘locus’ *Ty-1* é eficiente em condições epidêmicas, mas não impede reduções consideráveis de produtividade em condições de elevada pressão de inóculo. Desta forma, o manejo criterioso das mudas para evitar infecções precoces e intensas por espécies de *Begomovirus* pode resultar em ganhos de produtividade, mesmo em híbridos contendo o gene de resistência *Ty-1*.

Não foram observadas diferenças significativas na avaliação global no que se refere à época de inoculação para a maioria das variedades. Estes resultados indicam que mudas expostas a pressões elevadas de moscas-brancas virulíferas até os 36 dias podem sofrer perdas severas e equivalentes de produtividade. Desta forma, conclui-se que existem grandes possibilidades de atenuar os prejuízos econômicos causados por espécies de *Begomovirus* via utilização de técnicas mais adequadas de manejo (ex. produção de mudas livres de

pressões severas de moscas-brancas virulíferas) em combinação com a adoção de cultivares com resistência genética (ex. gene *Ty-1*).

**Tabela 1** - Efeito da época de exposição ao *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) na intensidade de sintomas em acessos de tomate com e sem o gene *Ty-1* de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias, (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa-de-vegetação, transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas a inoculação natural em campo.

| Acessos                   | GEV <sup>2</sup> | Intensidade de Sintomas <sup>1</sup> IS |         |         | MIS <sup>3</sup> | DIS <sup>4</sup> | CV <sup>5</sup> |
|---------------------------|------------------|---|---------|---------|------------------|------------------|-----------------|
|                           |                  | Época 1                                 | Época 2 | Época 3 |                  |                  |                 |
| 'H-7155'                  | I                | 3,52*                                   | 3,19    | 3,41    | 3,38 a           | A                | 3,3             |
| 'H-7155'                  | NI               | 1,24*                                   | 1,27    | 1,42    | 1,31 b           | AB               | 9,2             |
| 'H-9553'                  | I                | 3,53                                    | 3,70    | 3,61    | 3,61 a           | A                | 5,4             |
| 'H-9553'                  | NI               | 1,23                                    | 1,37    | 1,26    | 1,29 b           | AB               | 8,3             |
| 'H-9992'                  | I                | 3,56                                    | 3,59    | 3,63    | 3,59 a           | A                | 5,2             |
| 'H-9992'                  | NI               | 1,30                                    | 1,47    | 1,23    | 1,33 b           | AB               | 11,5            |
| 'U-2006'                  | I                | 3,21                                    | 3,75    | 3,81    | 3,59 a           | A                | 10,1            |
| 'U-2006'                  | NI               | 1,40                                    | 1,37    | 1,33    | 1,37 b           | AB               | 15,2            |
| 'U-232'                   | I                | 3,26                                    | 3,48    | 3,41    | 3,38 a           | A                | 7,9             |
| 'U-232'                   | NI               | 1,37                                    | 1,50    | 1,69    | 1,52 b           | A                | 14,7            |
| 'HEI-036' ( <i>Ty-1</i> ) | I                | 1,86                                    | 2,05    | 1,89    | 1,93 a           | B                | 14,3            |
| 'HEI-036' ( <i>Ty-1</i> ) | NI               | 1,17                                    | 1,13    | 1,20    | 1,17 b           | B                | 9,9             |
| 'Tospodoro'               | I                | 3,41                                    | 3,64    | 3,50    | 3,52 a           | A                | 2,3             |
| 'Tospodoro'               | NI               | 1,34                                    | 1,29    | 1,58    | 1,40 b           | AB               | 15,6            |

<sup>1</sup>Avaliação feita aos 40 dias após transplante com base em escala de notas de 1 a 4, onde 1 = ausência de sintomas e 4 = sintomas severos.

<sup>2</sup>GEV = Grupo de exposição ao vírus; onde (I) corresponde as épocas (idades) das plantas quando inoculadas (antes do transplante em campo) e (NI) corresponde as plantas controles (não-inoculadas) dentro de cada época (idade).

<sup>3</sup>MIS = Média da intensidade de sintomas de cada acesso de acordo com o respectivo GEV. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (em pares na coluna) não diferem entre si (Tukey 5%).

<sup>4</sup>DIS = Diferença entre acessos para IS dentro de cada um dos GEVs (I e NI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

<sup>5</sup>CV= Coeficiente de variação (%).

\*= Diferenças para IS não foram significativas dentro do grupo de inoculados (I) e não inoculados (NI) para as diferentes épocas avaliadas.

**Tabela 2** - Efeito da infecção viral e de diferentes épocas de exposição ao *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em componentes de produção e qualidade de frutos de acessos de tomate para processamento, com e sem o gene *Ty-1* de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa-de-vegetação, transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas à inoculação natural em campo.

| Componentes de produção e qualidade <sup>3</sup> | NÃO INOCULADO          |                        |                                     |                    | INOCULADO |           |                       |                    |
|--|------------------------|------------------------|-------------------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------------------|--------------------|
|  | Época 1                | Época 2                | Época 3                             | Média              | Época 1   | Época 2   | Época 3               | Média              |
| NFV  | 19,1 C <sup>1</sup> /a | 30,7 B <sup>1</sup> /a | 49,7 A <sup>1</sup> /a <sup>2</sup> | 33,1*              | 10,6 B/b  | 13,0 B /b | 18,7 A/b <sup>2</sup> | 14,1*              |
| NFM  | 72,3 A/a               | 62,1 B/a               | 41,2 C/a                            | 58,5*              | 33,0 A/b  | 28,1 AB/b | 22,5 B/b              | 27,9*              |
| NTF  | 91,4 A/a               | 92,8 A/a               | 90,8 A/a                            | 91,7*              | 43,6 A/b  | 41,0 A/b  | 41,2 A/b              | 41,9*              |
| PFV  | 0,4 C/a                | 0,9 B/a                | 1,6 A/a                             | 1,0*               | 0,2 B/b   | 0,2 B/b   | 0,4 A/b               | 0,3*               |
| PFM  | 3,6 A/a                | 3,4 A/a                | 2,2 B/a                             | 3,1*               | 1,2 A/b   | 1,0 B/b   | 0,8 B/b               | 1,0*               |
| PTF  | 4,0 A/a                | 4,3 A/a                | 3,8 A/a                             | 4,0*               | 1,4 A/b   | 1,2 A/b   | 1,2 A/b               | 1,3*               |
| PFP  | 4,0 B/a                | 4,4 AB/a               | 4,9 A/a                             | 4,4*               | 1,5 A/b   | 1,4 A/b   | 1,5 A/b               | 1,5*               |
| t/ha   | 104,6 A/a              | 106,6 A/a              | 82,9 B/a                            | 98,1*              | 36,2 A/b  | 32,7 A/b  | 32,3 A/b              | 33,7*              |
| PMeF   | 50,8 A/a               | 55,0 A/a               | 53,7 A/a                            | 53,1*              | 33,2 A/b  | 35,5 A/b  | 36,7 A/b              | 35,1*              |
| VIS  | 15,1 A/a               | 13,4 AB/a              | 12,7 B/a                            | 13,7 <sup>NS</sup> | 13,0 A/b  | 13,7 A/a  | 12,8 A/a              | 13,1 <sup>NS</sup> |
| BRIX   | 5,5 A/a                | 5,6 A/b                | 5,8 A/b                             | 5,7*               | 5,7 B/a   | 6,2 AB/a  | 6,4 A/a               | 6,1*               |
| AT   | 6,5 C/b                | 7,4 B/b                | 8,8 A/b                             | 7,6*               | 8,0 B/a   | 10,2 A/a  | 10 A/a                | 9,4*               |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si (Tukey 5%) dentro das épocas em cada grupo de exposição ao begomovírus ToSRV (não inoculado ou inoculado) em cada componente de produção ou qualidade.

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula indicam que contrastes entre pares de épocas nos diferentes grupos de exposição ao begomovírus ToSRV (não inoculado vs. inoculado) não diferem entre si (Tukey 5%).

<sup>3</sup>Componentes de produção e qualidade avaliados: NFV = número de frutos verdes por planta; NFM = número de frutos maduros por planta; NTF = número total de frutos por planta; PFV = peso de frutos verdes (kg) por planta; PFM = peso de frutos maduros (kg) por planta; PTF = peso total de frutos (kg) por planta; PFP = peso fresco da planta na colheita (kg), de cinco plantas representativas por parcela; t/ha = produção total da parcela convertida para produção por hectare; PMeF = Peso médio de frutos (g); Vis = viscosidade obtida pelo método do viscosímetro de Bostwick (em cm); Brix = teor de sólidos solúveis expresso em B° e AT = acidez titulável.

(\*) = diferença significativa e (NS) = diferença não-significativa (Tukey 5%) para o contraste.

**Tabela 3** - Efeito da infecção viral e de diferentes épocas de exposição ao *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em componentes de produção envolvendo o número de frutos produzidos por acessos de tomate para processamento, com e sem o gene *Ty-1* de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa-de-vegetação, transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas à inoculação natural em campo.

| Componentes de Produção* | Híbridos  | Não Inoculado          |                         |                                     |                      | Inoculado              |           |           |                      |
|--------------------------|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------|------------------------|-----------|-----------|----------------------|
|                          |           | Época 1                | Época 2                 | Época 3                             | Média                | Época 1                | Época 2   | Época 3   | Média                |
| NFV                      | 'H-7155'  | 14,0 A <sup>1</sup> /b | 29,0 A <sup>1</sup> /ab | 39,8 A <sup>1</sup> /a <sup>2</sup> | 27,6 ab <sup>2</sup> | 8,7 A/ab <sup>2</sup>  | 8,5 A/a   | 15,1 A/b  | 10,8 b <sup>2</sup>  |
|                          | 'H-9553'  | 35,2 A/a               | 48,5 A/a                | 53,2 A/a <sup>2</sup>               | 45,7 a <sup>2</sup>  | 12,5 A/ab <sup>2</sup> | 12,8 A/a  | 19,0 A/ab | 14,8 ab <sup>2</sup> |
|                          | 'H-9992'  | 17,9 A/b               | 30,4 A/ab               | 44,9 A/a                            | 31,03 ab             | 12,7 A/ab              | 14,8 A/a  | 21,6 A/ab | 16,3 ab              |
|                          | 'U-2006'  | 17,4 B/b               | 28,3 B/ab               | 52,7 A/a                            | 32,8 ab              | 9,9 A/ab               | 6,5 A/a   | 11,3 A/b  | 9,2 b                |
|                          | 'U-232'   | 16,5 B/b               | 36,9 AB/ab              | 60,9 A/a                            | 38,1 ab              | 9,3 A/ab               | 18,0 A/a  | 16,3 A/b  | 14,6 b               |
|                          | 'HEI-036' | 19,8 B/ab              | 23,1 B/ab               | 59,0 A/a                            | 33,9 ab              | 14,9 B/a               | 18,8 B/a  | 31,4 A/a  | 21,7 a               |
|                          | Tospodoro | 12,5 B/b               | 18,6 B/b                | 37,0 A/a                            | 22,7 b               | 6,0 A/b                | 11,4 A/a  | 16,3 A/b  | 11,2 b               |
|                          | CV**      | 30,3                   | 32,27                   | 32,8                                | 37,3                 | 25,7                   | 48,9      | 25,7      | 34,6                 |
| NFM                      | 'H-7155'  | 60,3 A/BC              | 57,5 A/a                | 41,6 A/ab                           | 53,1 bc              | 18,4 A/b               | 18,5 A/b  | 16,2 A/b  | 17,7 b               |
|                          | 'H-9553'  | 94,2 A/a               | 69,7 B/a                | 38,4 C/ab                           | 67,4 ab              | 26,9 A/b               | 20,9 A/b  | 19,6 A/b  | 22,5 b               |
|                          | 'H-9992'  | 88,8 A/ab              | 57,3 A/a                | 43,3 A/ab                           | 63,1 ab              | 33,4 A/b               | 22,5 A/b  | 15,0 A/b  | 23,6 b               |
|                          | 'U-2006'  | 50,3 A/c               | 56,2 A/a                | 31,9 A/b                            | 45,9 c               | 27,9 A/b               | 23,1 A/b  | 14,6 A/b  | 21,9 b               |
|                          | 'U-232'   | 72,2 A/abc             | 57,8 B/a                | 31,1 B/b                            | 53,7 bc              | 24,7 A/b               | 30,5 A/b  | 17,4 A/b  | 24,2 b               |
|                          | 'HEI-036' | 89,4 A/a               | 73,7 AB/a               | 57,6 B/a                            | 73,6 a               | 79,8 A/a               | 56,1 AB/a | 47,7 B/a  | 61,2 a               |
|                          | Tospodoro | 51,1 A/c               | 62,6 A/a                | 45,1 A/ab                           | 52,9 bc              | 19,9 B/b               | 24,8 AB/b | 27,1 A/b  | 23,9 b               |
|                          | CV**      | 13,8                   | 24,3                    | 18,8                                | 20                   | 23,7                   | 26,7      | 22,6      | 26,7                 |
| NTF                      | 'H-7155'  | 74,3 A/c               | 86,4 A/a                | 81,4 A/a                            | 80,7 bc              | 27,1 A/b               | 27,0 A/b  | 31,3 A/b  | 28,5 b               |
|                          | 'H-9553'  | 129,4 A/a              | 118,2 AB/a              | 91,6 B/a                            | 113,1 a              | 39,5 A/b               | 33,7 A/b  | 38,6 A/b  | 37,2 b               |
|                          | 'H-9992'  | 106,7 A/ab             | 87,6 A/a                | 88,2 A/a                            | 94,2 abc             | 46,1 A/b               | 37,3 A/b  | 36,6 A/b  | 40,0 b               |
|                          | 'U-2006'  | 67,7 A/c               | 84,5 A/a                | 83,9 A/a                            | 78,7 bc              | 37,7 A/b               | 29,6 A/b  | 25,9 A/b  | 31,1 b               |
|                          | 'U-232'   | 88,7 A/bc              | 94,7 A/a                | 92,0 A/a                            | 91,8 abc             | 34,0 A/b               | 48,6 A/ab | 33,7 A/b  | 38,8 b               |
|                          | 'HEI-036' | 109,2 A/ab             | 96,8 A/a                | 116,7 A/a                           | 107,6 ab             | 94,7 A/a               | 74,9 A/a  | 79,2 A/a  | 82,9 a               |
|                          | Tospodoro | 63,6 A/c               | 81,1 A/a                | 82,1 A/a                            | 75,6 c               | 25,9 B/b               | 36,2 AB/b | 43,4 A/b  | 53,2 b               |
|                          | CV**      | 11,7                   | 21,7                    | 23,4                                | 21,6                 | 22,4                   | 31,2      | 18,8      | 24,0                 |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula indicam que elas não diferem entre si (Tukey 5%) dentro das épocas em cada grupo de exposição ao vírus (não inoculado e inoculado com ToSRV).

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna indicam contrastes entre a mesma variável dentro de cada acesso nos diferentes grupos de exposição ao vírus (não inoculado ou inoculado com ToSRV) e não diferem entre si (Tukey 5%).

\* = Componentes de produção avaliados: NFV = número de frutos verdes por planta; NFM = número de frutos maduros por planta; NTF = número total de frutos por planta.

\*\* CV = coeficiente de variação.

**Tabela 4** - Efeito da infecção viral e de diferentes épocas de exposição ao *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em componentes de produção de acessos de tomate para processamento, com e sem o gene *Ty-1* de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias (épocas 1, 2 e 3 respectivamente) foram inoculadas com ToSRV em casa-de-vegetação e transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas à inoculação natural em campo.

| Componentes de Produção* | Híbridos    | Não Inoculado                      |                       |                       |                    | Inoculado |          |                      |                      |
|--------------------------|-------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------|----------|----------------------|----------------------|
|                          |             | Época 1                            | Época 2               | Época 3               | Média              | Época 1   | Época 2  | Época 3              | Média                |
| PFV                      | 'H-7155'    | 0,3 A <sup>1</sup> /b <sup>2</sup> | 1,2 A <sup>1</sup> /a | 1,4 A <sup>1</sup> /a | 1,0 a <sup>2</sup> | 0,1 A/a   | 0,2 A/a  | 0,5 A/a <sup>2</sup> | 0,25 ab <sup>2</sup> |
|                          | 'H-9553'    | 0,9 A/a <sup>2</sup>               | 1,2 A/a               | 1,3 A/a               | 1,1 a <sup>2</sup> | 0,1 A/a   | 0,2 A/a  | 0,3 A/a <sup>2</sup> | 0,2ab <sup>2</sup>   |
|                          | 'H-9992'    | 0,3 B/b                            | 0,7 AB/a              | 1,4 A/a               | 0,8 a              | 0,2 A/a   | 0,2 A/a  | 0,4 A/a              | 0,2 ab               |
|                          | 'U-2006'    | 0,3 B/b                            | 0,7 B/a               | 2,2 A/a               | 1,1 a              | 0,1 A/a   | 0,1 A/a  | 0,3 A/a              | 0,2 b                |
|                          | 'U-232'     | 0,5 B/ab                           | 1,2 AB/a              | 2,2 A/a               | 1,3 a              | 0,3 A/a   | 0,2 A/a  | 0,4 A/a              | 0,3 ab               |
|                          | 'HEI-036'   | 0,3 B/b                            | 0,6 AB/a              | 1,5 A/a               | 0,8 a              | 0,2 B/a   | 0,3 B/a  | 0,7 A/a              | 0,4 a                |
|                          | 'Tospodoro' | 0,3 B/b                            | 0,7 AB/a              | 1,2 A/a               | 0,7 a              | 0,1 A/a   | 0,2 A/a  | 0,3 A/a              | 0,2 b                |
|                          | CV**        | 37,9                               | 55,7                  | 33                    | 44,1               | 69        | 38,1     | 47,5                 | 57,9                 |
| PFM                      | 'H-7155'    | 3,5 A/ab                           | 4,2 A/a               | 2,5 A/ab              | 3,4 ab             | 0,8 A/b   | 0,7 A/b  | 0,8 A/b              | 0,77 b               |
|                          | 'H-9553'    | 4,6 A/a                            | 3,2 B/a               | 1,5 C/b               | 3,1 ab             | 0,7 A/b   | 0,7 A/b  | 0,5 A/b              | 0,6 b                |
|                          | 'H-9992'    | 3,1 A/ab                           | 2,5 A/a               | 1,9 A/ab              | 2,5 b              | 0,8 A/b   | 0,6 A/b  | 0,5 A/b              | 0,7 b                |
|                          | 'U-2006'    | 3,0 A/ab                           | 3,3 A/a               | 2,1 A/ab              | 2,8 ab             | 1,1 A/b   | 0,7 A/b  | 0,5 A/b              | 0,8 b                |
|                          | 'U-232'     | 3,9 A/ab                           | 3,5 AB/a              | 1,9 B/ab              | 3,1 ab             | 0,7 B/b   | 1,1 A/b  | 0,7 B/b              | 0,8 b                |
|                          | 'HEI-036'   | 4,3 A/a                            | 4,4 A/a               | 3,0 B/a               | 3,9 a              | 3,8 A/a   | 2,1 B/a  | 1,9 B/a              | 2,6 a                |
|                          | 'Tospodoro' | 2,6 A/b                            | 2,9 A/a               | 2,5 A/ab              | 2,6 b              | 0,5 A/b   | 0,8 A/b  | 0,8 A/b              | 0,7 b                |
|                          | CV**        | 16,2                               | 28,4                  | 22,3                  | 24,7               | 24,7      | 31,6     | 25,7                 | 27,2                 |
| PTF                      | 'H-7155'    | 3,8 A/a                            | 5,4 A/a               | 3,9 A/a               | 4,3 a              | 0,9 A/b   | 0,9 A/b  | 1,2 A/b              | 1,0 b                |
|                          | 'H-9553'    | 5,5 A/a                            | 4,4 A/a               | 2,8 B/a               | 4,2 a              | 0,8 A/b   | 0,9 A/b  | 0,7 A/b              | 0,8 b                |
|                          | 'H-9992'    | 3,4 A/b                            | 3,2 A/a               | 3,3 A/a               | 3,3 a              | 1,02 A/b  | 0,8 A/b  | 0,9 A/b              | 0,9 b                |
|                          | 'U-2006'    | 3,4 A/b                            | 4,1 A/a               | 4,3 A/a               | 3,9 a              | 1,2 A/b   | 0,8 A/b  | 0,8 A/b              | 0,9 b                |
|                          | 'U-232'     | 4,5 A/ab                           | 4,8 A/a               | 4,1 A/a               | 4,4 a              | 1,1 A/b   | 1,4 A/ab | 1,1 A/b              | 1,2 b                |
|                          | 'HEI-036'   | 4,6 A/ab                           | 5,0 A/a               | 4,5 A/a               | 4,7 a              | 4,0 A/a   | 2,4 B/a  | 2,6 AB/a             | 3,0 a                |
|                          | 'Tospodoro' | 2,8 A/b                            | 3,6 A/a               | 3,7 A/a               | 3,4a               | 0,6 B/b   | 1,0 AB/b | 1,1 A/b              | 0,9 b                |
|                          | CV**        | 17,1                               | 31,8                  | 23                    | 26,3               | 24,9      | 31,4     | 24,5                 | 26,3                 |
| PFP                      | 'H-7155'    | 4,5 A/a                            | 4,4 A/a               | 4,6 A/a               | 4,5 a              | 1,1 A/b   | 1,5 A/b  | 1,2 A/b              | 1,3 b                |
|                          | 'H-9553'    | 4,7 A/a                            | 3,9 A/a               | 4,5 A/a               | 4,3 a              | 1,0 A/b   | 1,0 A/b  | 1,1 A/b              | 1,0 b                |
|                          | 'H-9992'    | 4,5 A/a                            | 4,7 A/a               | 5,2 A/a               | 4,8 a              | 1,0 A/b   | 1,1 A/b  | 1,4 A/b              | 1,2 b                |
|                          | 'U-2006'    | 3,6 B/a                            | 4,8 AB/a              | 5,4 A/a               | 4,6 a              | 1,5 A/b   | 1,3 A/b  | 1,3 A/b              | 1,4 b                |
|                          | 'U-232'     | 3,5 A/a                            | 4,3 A/a               | 4,5 A/a               | 4,1 a              | 1,1 A/b   | 1,4 A/b  | 1,5 A/b              | 1,3 b                |
|                          | 'HEI-036'   | 3,9 A/a                            | 4,4 A/a               | 5,0 A/a               | 4,4 a              | 3,5 A/a   | 2,5 A/a  | 2,6 A/a              | 2,9 a                |
|                          | 'Tospodoro' | 3,5 B/a                            | 4,3 AB/a              | 5,4 A/a               | 4,4 b              | 1,4 A/b   | 1,3 A/b  | 1,4 A/b              | 1,4 b                |
|                          | CV**        | 17,8                               | 21,6                  | 24,2                  | 21,7               | 23,7      | 20,9     | 18,6                 | 21,2                 |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula indicam que elas não diferem entre si (Tukey 5%) dentro das épocas em cada grupo de exposição ao vírus (não inoculado e inoculado com ToSRV).

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna indicam contrastes entre a mesma variável dentro de cada acesso nos diferentes grupos de exposição ao vírus (não inoculado ou inoculado com ToSRV) e não diferem entre si (Tukey 5%).

<sup>3</sup>Componentes de produção e qualidade avaliados: PFV= peso de frutos verdes (kg) por planta; PFM= peso de frutos maduros (kg) por planta; PTF= produção total de frutos (kg) por planta; PFP= peso fresco da planta na colheita (kg) de cinco plantas representativas por parcela.

\*CV = coeficiente de variação.



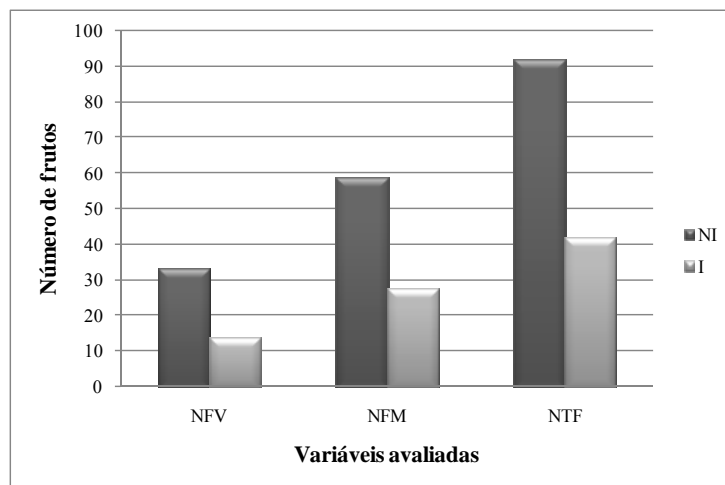
**Tabela 5** - Efeito da infecção viral e de diferentes épocas de exposição ao *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em componentes de qualidade de acessos de tomate para processamento, com e sem o gene *Ty-1* de resistência a begomovírus. Plantas com idades de 22, 29 e 36 dias, denominados épocas 1, 2 e 3 respectivamente, foram inoculadas com ToSRV em casa-de-vegetação, transplantadas com os respectivos controles não inoculados e expostas à inoculação natural em campo.

| Componentes de Produção* | Acessos de tomateiro | Não Inoculado |            |            |                       | Inoculado |            |           |          |
|--------------------------|----------------------|---------------|------------|------------|-----------------------|-----------|------------|-----------|----------|
|                          |                      | Época 1       | Época 2    | Época 3    | Média                 | Época 1   | Época 2    | Época 3   | Média    |
| VIS                      | 'H-7155'             | 18,0 A/a      | 13,4 B/abc | 13,0 B/abc | 14,8 abc <sup>3</sup> | 13,1 A/a  | 15,0 A/abc | 15,4 A/a  | 14,5 abc |
|                          | 'H-9553'             | 11,2 A/a      | 11,0 A/c   | 9,2 A/c    | 10,1 d <sup>3</sup>   | 10,5 A/a  | 10,0 A/de  | 9,9 A/b   | 10,1 d   |
|                          | 'H-9992'             | 11,0 A/a      | 10,0 A/c   | 9,4 A/c    | 10,1 d                | 10,4 A/a  | 9,4 A/e    | 11,0 A/ab | 10,3 d   |
|                          | 'U-2006'             | 16,6 A/a      | 13,9 A/abc | 12,6 A/abc | 14,4 bc               | 13,2 A/a  | 13 A/cde   | 13 A/ab   | 13,1 bc  |
|                          | 'U-232'              | 13,7 A/a      | 12,0 A/bc  | 11,1 A/bc  | 12,3 cd               | 11,7 A/a  | 13,4 A/bcd | 12,6 A/ab | 12,5 d   |
|                          | 'HEI-036'            | 17,5 A/a      | 16,2 A/ab  | 15,8 A/ab  | 16,5 ab               | 16,0 A/a  | 17,1 A/ab  | 12,4 A/ab | 15,2 ab  |
|                          | 'Tospodoro'          | 17,5 A/a      | 18,7 A/a   | 17,6 A/a   | 17,9 a                | 15,7 A/a  | 17,8 A/a   | 15,4 A/a  | 16,3 a   |
|                          | CV**                 | 17,2          | 14,2       | 16,6       | 16,3                  | 15,7      | 9,9        | 13        | 12,5     |
| BRIX                     | 'H-7155'             | 5,6 A/a       | 5,5 A/a    | 5,9 A/a    | 5,6 ab                | 5,9 A/a   | 6,1 A/ab   | 5,8 A/a   | 5,9 a    |
|                          | 'H-9553'             | 5,1 A/a       | 5,5 A/a    | 5,9 A/a    | 5,5 ab                | 5,7 A/a   | 6,6 A/ab   | 6,6 A/a   | 6,3 a    |
|                          | 'H-9992'             | 6,1 A/a       | 6,0 A/a    | 6,3 A/a    | 6,1 a                 | 5,2 B/a   | 6,9 A/a    | 6,8 A/a   | 6,3 a    |
|                          | 'U-2006'             | 5,7 A/a       | 5,8 A/a    | 6,0 A/a    | 5,9 ab                | 6,2 A/a   | 6,9 A/a    | 6,8 A/a   | 6,6 a    |
|                          | 'U-232'              | 5,4 A/a       | 6,1 A/a    | 5,6 A/a    | 5,7ab                 | 6,5 A/a   | 6,2 A/ab   | 6,1 A/a   | 6,3 a    |
|                          | 'HEI-036'            | 5,5 A/a       | 5,2 A/a    | 5,8 A/a    | 5,5 ab                | 5,1 A/a   | 5,5 A/b    | 6,0 A/a   | 5,6 a    |
|                          | 'Tospodoro'          | 5,3 A/a       | 5,1 A/a    | 5,4 A/a    | 5,3 b                 | 5,5 A/a   | 5,4 A/b    | 6,5 A/a   | 5,8 a    |
|                          | CV**                 | 11,3          | 9,6        | 7,3        | 9,5                   | 13,1      | 6,9        | 12,7      | 12,1     |
| AT                       | 'H-7155'             | 6,3 B/a       | 7,1 B/a    | 8,9 A/a    | 7,4 ab                | 8,1 A/ab  | 10,5 A/ab  | 8,4 A/a   | 9,0 abc  |
|                          | 'H-9553'             | 4,8 B/a       | 6,6 AB/a   | 8,1 A/a    | 6,5 b                 | 7,0 B/b   | 9,3 A/b    | 9,8 A/a   | 8,7 bc   |
|                          | 'H-9992'             | 6,6 A/a       | 7,5 A/a    | 7,7 A/a    | 7,2 ab                | 6,5 B/b   | 12,0 A/a   | 11,0 A/a  | 9,8 abc  |
|                          | 'U-2006'             | 6,5 A/a       | 8,8 A/a    | 10,1 A/a   | 8,5 a                 | 8,9 A/ab  | 11,0 A/ab  | 11,2 A/a  | 10,4 ab  |
|                          | 'U-232'              | 7,2 B/a       | 7,7 AB/a   | 9,3 A/a    | 8,05 ab               | 11,2 A/a  | 11,0 A/ab  | 10,1 A/a  | 10,8 a   |
|                          | 'HEI-036'            | 7,7 A/a       | 7,3 A/a    | 9,6 A/a    | 8,2 a                 | 6,9 A/b   | 8,4 A/b    | 9,4 A/a   | 8,3 c    |
|                          | 'Tospodoro'          | 6,8 A/a       | 6,6 AB/a   | 7,9 A/a    | 7,1 ab                | 7,6 B/ab  | 8,9 AB/b   | 9,7 A/a   | 8,7 bc   |
|                          | CV**                 | 17,4          | 22,3       | 12,5       | 14,2                  | 18,3      | 9,2        | 16,7      | 14,6     |
| PMeF                     | 'H-7155'             | 57,0 A/ab     | 71,9 A/a   | 60 A/ab    | 63,0 a                | 43,0 A/ab | 36,2 A/a   | 49,1 A/a  | 42,8 a   |
|                          | 'H-9553'             | 48,8 A/ab     | 45,6 A/a   | 39,0 A/d   | 45,5 bc               | 24,6 A/b  | 36,7 A/a   | 25,2 A/b  | 28,9 a   |
|                          | 'H-9992'             | 34,9 A/b      | 40,2 A/a   | 43,9 A/ed  | 40,0 c                | 25,4 A/b  | 36,1 A/a   | 37,0 A/ab | 32,9 a   |
|                          | 'U-2006'             | 59,5 A/a      | 57,8 A/a   | 65,9 A/a   | 61,1 a                | 36,8 A/ab | 29,6 A/a   | 35,6 A/ab | 34,0 a   |
|                          | 'U-232'              | 55,8 A/ab     | 59,7 A/a   | 60,0 A/ab  | 58,5 a                | 29,7 A/ab | 38,3 A/a   | 39,3 A/ab | 35,8 a   |
|                          | 'HEI-036'            | 48,8 A/ab     | 63,3 A/a   | 52,3 A/bc  | 54,8 ab               | 47,5 A/a  | 37,2 A/a   | 40,9 A/ab | 41,9 a   |
|                          | 'Tospodoro'          | 50,7 A/ab     | 46,3 A/a   | 54,8 A/abc | 51,0 abc              | 25,3 A/b  | 34,2 A/a   | 29,9 A/b  | 29,8 a   |
|                          | CV**                 | 15,4          | 22,3       | 7,5        | 16,04                 | 20,9      | 36,6       | 15,7      | 27,2     |
| t/ha                     | 'H-7155'             | 85,1 A/abc    | 106,1 A/a  | 67,9 A/b   | 86,0 b                | 22,1 A/b  | 22,4 A/b   | 29,3 A/b  | 24,6 b   |
|                          | 'H-9553'             | 144,7 A/a     | 105,7 AB/a | 52,5 B/b   | 101,0 ab              | 20,7 A/b  | 24,5 A/b   | 20,2 A/b  | 21,8 b   |
|                          | 'H-9992'             | 81,0 A/bc     | 77,6 A/a   | 79,3 A/ab  | 79,0 b                | 24,4 A/b  | 23,0 A/b   | 26,0 A/b  | 24,5 b   |
|                          | 'U-2006'             | 73,4 A/c      | 90,7 A/a   | 85,2 A/ab  | 83,0 b                | 27,1 A/b  | 25,9 A/b   | 23,6 A/b  | 25,5 b   |
|                          | 'U-232'              | 120,5 A/abc   | 107,0 A/a  | 72,6 A/ab  | 100,0 b               | 24,0 A/b  | 37,6 A/b   | 28,2 A/b  | 29,9 b   |
|                          | 'HEI-036'            | 142,8 A/ab    | 151,1 A/a  | 137,1 A/a  | 144,0 a               | 119,1 A/a | 63,7 B/a   | 64,9 B/a  | 82,5 a   |
|                          | 'Tospodoro'          | 85,0 A/abc    | 107,9 A/a  | 86 A/ab    | 93,0 b                | 15,7 B/b  | 31,6 AB/b  | 34,2 A/b  | 27,2 b   |
|                          | CV**                 | 21            | 35,6       | 28,8       | 30,3                  | 30,6      | 26,3       | 27,3      | 28,3     |

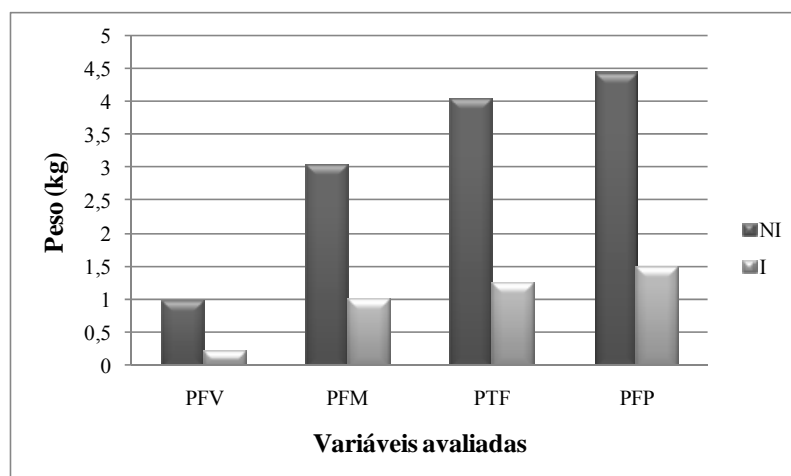
<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula indicam que elas não diferem entre si (Tukey 5%) dentro das épocas em cada grupo de exposição ao vírus (não inoculado e inoculado com ToSRV).

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna indicam contrastes entre a mesma variável dentro de cada acesso nos diferentes grupos de exposição ao vírus (não inoculado ou inoculado com ToSRV) e não diferem entre si (Tukey 5%).

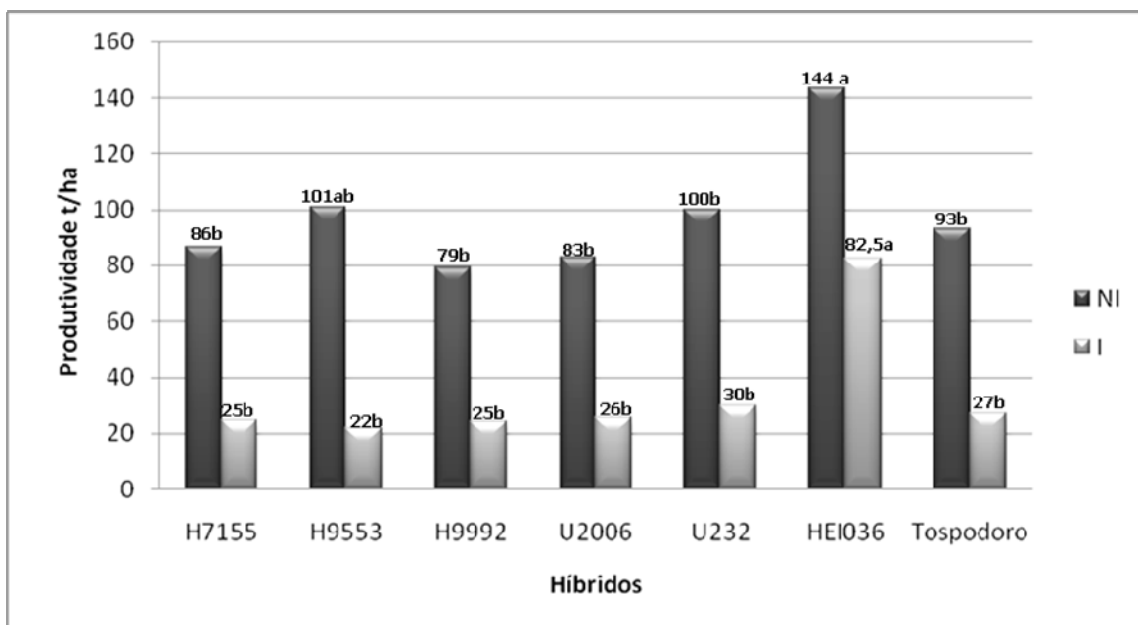
\*Componentes de qualidade avaliados: Vis= viscosidade, obtida pelo método do viscosímetro de Bostwick (em cm); Brix= teor de sólidos solúveis expresso em B°; AT= acidez titulável da polpa; PMeF= peso médio de frutos (g); t/ha= produção total da parcela convertida para produção por hectare. \*\*CV = Coeficiente de variação.



**Figura 1** - Análise global do efeito da infecção por *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em três componentes (variáveis) de produção de sete acessos de tomateiro inoculados (I) e não-inoculados (NI) em diferentes idades (épocas) após a semeadura. NFV = Número de frutos verdes por planta, NFM = Número de frutos maduros por planta e NTF = Número total de frutos por planta. As diferenças entre os grupos NI e I foram significativas (Tukey 5%) para todos os três componentes avaliados.



**Figura 2** - Análise global do efeito da infecção por *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em quatro componentes (variáveis) de produção de sete acessos de tomateiro inoculados (I) e não-inoculados (NI) em diferentes idades (épocas) após a semeadura. PFV = Peso de frutos verdes por planta; PFM = Peso de frutos maduros por planta; PTF = Peso total de frutos por planta e PFP = Peso fresco da planta. As diferenças entre os grupos NI e I foram significativas (Tukey 5%) para todos os quatro componentes avaliados.



**Figura 3** - Análise global do efeito da infecção por *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) na produtividade (t/ha) de sete acessos de tomateiro inoculados (I) e não-inoculados (NI) em diferentes idades (épocas) após a semeadura. O híbrido ‘HEI-036’ possui o ‘locus’ de resistência *Ty-1* em heterozigose. Os demais híbridos não possuem genes de resistência ao ToSRV. Valores (de produtividade) seguidos pela mesma letra (dentro de cada grupo NI ou I) não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade e encontram-se representados acima das barras.

## CAPÍTULO 3

### **Fontes de resistência em *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) a espécies de *Meloidogyne* e *Begomovirus* monopartido e bipartido**

Rita de Cássia Pereira-Carvalho<sup>1,2,3</sup>, Leonardo S. Boiteux<sup>1</sup>, Maria Esther de Noronha Fonseca<sup>1</sup>, Enrique Moriones<sup>3</sup>, Rafael Fernandez-Muñoz<sup>3</sup>, Juan A. Diaz-Pendón<sup>3</sup>, João Maria Charchar<sup>1</sup> e Renato O. Resende<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPQ), Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-

<sup>2</sup>UnB - Departamentos de Fitopatologia e Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília-DF, Brasil

<sup>3</sup>Estación Experimental 'La Mayora', CSIC, 29760 Algarrobo-Costa (Málaga), Espanha.

## RESUMO

O 'locus' *Ty-1* de tomate confere amplo espectro de resistência a espécies de *Begomovirus* e a expressão fenotípica é aumentada em linhas homozigotas. Entretanto genes de resistência a begomovírus parecem estar ligados em repulsão com o gene que confere resistência a *Meloidogyne* spp. Setenta e um acessos de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) foram avaliados com mistura de ovos e juvenis de uma população de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e inoculados com *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) em condições de casa-de-vegetação. Os acessos foram posteriormente transplantados em campo naturalmente infestados com nematóides e expostos à inoculação natural de begomovírus por mosca-branca. O índice de severidade (IS) variou de 1= ausência de sintomas a 4= sintomas severos. Um conjunto de 17 acessos (pertencente ao complexo de *Solanum peruvianum*) que combinou altos níveis de resistência a *Meloidogyne* spp. e a ToRMV ( $IS \leq 1.1$ ) foram selecionados e avaliados na Espanha frente à agroinoculação de estirpes de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV). Os sintomas foram avaliados e a acumulação viral foi monitorada mediante hibridização de DNA usando sondas espécie-específicas. Os acessos avaliados mostraram resistência a begomovírus monopartidos. Estes acessos combinando resistência a espécies de *Meloidogyne* bem como a begomovírus monopartidos e bipartidos são úteis em programas de melhoramento para desenvolver linhas elites expressando estas características desejáveis.

## ABSTRACT

The tomato *Ty-1* 'locus' confers wide-spectrum tolerance to *Begomovirus* species and its phenotypic expression is improved in homozygous lines. However, the repulsion phase linkage with susceptibility to *Meloidogyne* species is hampering the large-scale development of stable and multi-resistant hybrids. Seventy-one *Solanum* spp. (section *Lycopersicon*) accessions were simultaneously evaluated using a mixture of *M. incognita* and *M. javanica* eggs and juveniles and whitefly-inoculated with *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) under greenhouse conditions. Accessions were then transplanted into nematode-infested field with natural viruliferous whitefly pressure. A severity index (SI), from 1= no symptoms to 4= severe symptoms was used for evaluation. A sub-set of 17 accessions (belonging to the former *S. peruvianum* species complex), combining high levels of resistance to *Meloidogyne* spp. and to ToRMV ( $SI \leq 1.1$ ) were selected and then evaluated in Spain against monopartite strains of the *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) using infectious clones by agroinoculation. Symptoms were scored and virus accumulation was monitored by DNA hybridization using species-specific probes. The accessions displayed also resistance to monopartite begomoviruses. From the tomato-breeding standpoint, accessions combining resistance to prevalent *Meloidogyne* species as well as mono and bipartite begomoviruses might be useful for the development of elite lines expressing these traits.

## INTRODUÇÃO

O cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) (Peralta *et al.*, 2005) tem sido severamente afetado por espécies de *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) e por nematóides do gênero *Meloidogyne* (família *Meloidogynidae*) em diversas regiões do mundo (Subbotin *et al.*, 2006 e Fauquet *et al.*, 2008).

A família *Geminiviridae* engloba os vírus de DNA fita simples, circular, encapsidado em partícula icosaédrica e geminada. A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*) de acordo com a organização genômica, o tipo de inseto vetor, a gama de hospedeiros e o relacionamento filogenético. Os três primeiros gêneros englobam vírus com genoma monopartido ao passo que vírus classificados em

*Begomovirus* apresentam genoma bipartido ou monopartido. *Begomovirus*, o gênero mais numeroso e mais importante (Faria *et al.*, 2000; Freitas-Astúa, 2002 e Varma & Malathi, 2003) dentro de *Geminiviridae*, é considerado emergente devido ao aumento na incidência e severidade das doenças causadas por eles nas últimas décadas, constituindo uma das maiores ameaças à agricultura, principalmente, devido à adaptação do seu vetor *Bemisia tabaci* Gen. (Hemiptera: *Aleyrodidae*) a regiões tropicais e subtropicais (Brown *et al.*, 1995; Morales & Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003; Varma & Malathi, 2003 e Seal *et al.*, 2006).

No Velho Mundo, especialmente na região do Mar Mediterrâneo, predomina o ‘complexo viral denominado Tomato yellow leaf curl disease’ (TYLCD) (Cohen & Harpaz, 1964; Al-Musa, 1982; Moriones *et al.*, 1993; Monci *et al.*, 2000 e Jones, 2003). Este ‘complexo viral’ é formado por nove espécies (Fauquet *et al.*, 2008) e duas novas espécies recentemente reconhecidas: *Tomato yellow leaf curl Vietnam virus* (TYLCVV) e *Tomato yellow leaf curl Indonesia virus* (TYLCIDV) e ademais cinco espécies tentativas, segundo os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV). Espécies virais deste complexo foram introduzidas e disseminadas na América do Norte (Ingram & Henn, 2001 e Valverde *et al.*, 2001), norte da América do Sul, América Central e Caribe (Polston *et al.*, 1994 e Ramos *et al.*, 1996).

No Brasil, até o presente momento, todas as espécies relatadas são de isolados de begomovírus bipartidos, cuja incidência e severidade foram significativamente ampliadas com a introdução no país do biótipo B de *B. tabaci*, que contribuiu também para o aumento da diversidade de espécies e número de recombinantes (França *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003 e Inoue-Nagata *et al.*, 2006). Em estudos de infecção precoce de begomovírus em ‘Viradoro’ (cultivar suscetível) foi verificada uma menor produção total e uma redução no número de frutos por plantas em torno de 60% em ambos casos (Giordano *et al.*, 2005a).

Devido à grande diversidade de espécies de *Begomovirus* existentes em todas as regiões onde o tomateiro é cultivado de maneira intensiva e à dificuldade de controle químico de *B. tabaci*, que além de oneroso, tem propiciado o desenvolvimento de populações resistentes a inseticidas, a melhor opção tem sido o emprego de cultivares resistentes ao vírus e/ou ao vetor. Programas de melhoramento têm se baseado na

introgressão de genes de resistência presentes em espécies silvestres de *Solanum* para a espécie cultivada *S. lycopersicum*. Vários níveis de resistência a *Tomato yellow leaf curl virus* TYLCV e também aos isolados brasileiros têm sido encontrados em *S. pimpinellifolium* L., *S. habrochaites* Knapp & Spooner, *S. peruvianum* L., *S. cheesmaniae* (Riley) Fosberg e *S. chilense* (Dunal) Reiche (revisão em Picó *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 1999; Picó *et al.*, 1999; Pilowsky & Cohen, 2000 e Santana *et al.*, 2001). Vários estudos de herança têm sugerido que o controle genético de resistência depende da combinação entre a base genética do hospedeiro e a espécie viral (Morales, 2001). Os genes/'loci' de resistência *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *tcm-1* e *tgr-1* (Michelson *et al.*, 1994; Zamir *et al.*, 1994; Hanson *et al.*, 2000; Giordano *et al.*, 2005b; Hanson *et al.*, 2006; Bian *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2007 e García-Cano *et al.*, 2008) já estão sendo utilizados em diferentes programas de melhoramento para resistência a begomovírus no mundo, e iniciativas de piramidização de alguns destes genes já se encontram em andamento (Vidavski *et al.*, 2008). O 'locus' *Ty-1* foi introgridido de *S. chilense* (Michelson *et al.*, 1994 e Zamir *et al.*, 1994). O 'locus' *Ty-2* foi introgridido a partir de *S. habrochaites* (Hanson *et al.*, 2000 e Lapidot & Friedmann, 2002). A resistência recessiva a begomovírus pode ser conferida por *tcm-1*, proveniente de *S. lycopersicum*, derivado do híbrido 'Tyking', presente em linhagens originadas do genótipo 'TX-468-RG' (Giordano *et al.*, 2005b e García-Cano *et al.*, 2008) e *tgr-1* presente em 'FLA-653', que é derivada de um cruzamento envolvendo *S. chilense* ('LA-2779') e Tyking (Bian *et al.*, 2007). *Ty-3*, parcialmente dominante, foi derivado de 'LA-2779' e confere alto nível de resistência a TYLCV e resistência a bipartidos (Ji & Scott, 2006). De acordo com Bian *et al.* (2007) 'Tyking', cuja origem é desconhecida, deve contribuir com a resistência presente em 'FLA- 653'.

Em relação ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) o uso de cultivares resistentes também tem sido a medida mais eficiente e econômica, reduzindo consideravelmente os danos ocasionados por estes patógenos na cultura do tomateiro (Jianhua *et al.*, 2001), que é altamente suscetível e considerada uma das hortaliças que mais sofre danos, principalmente pela associação de *M. incognita* e *M. javanica*. Acessos de *Solanum* spp. resistentes a *Meloidogyne* foram obtidos por Bailey (1941) e Romshe (1942). Smith (1944) introgridiu o gene de resistência, mais tarde caracterizado como gene *Mi*, de *S. peruvianum* para *S. lycopersicum* através da técnica de cultivo de embriões. O gene *Mi*



(Gilbert & Mcguire, 1956), confere resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, mas não a *M. hapla* (Ammati *et al.*, 1985), sendo a resistência quebrada em ambiente com temperatura acima de 28° C (Dropkin, 1969) e também por alguns isolados das espécies anteriormente citadas (Bost & Triantaphyllou, 1982). Posteriormente, outros genes/alelos foram relatados em outras cultivares (Sidhu & Webster, 1973), assim como novas fontes de genes de resistência foram identificadas (Ammati *et al.*, 1985 e Roberts *et al.*, 1990), sendo designados genes *Mi-2* até *Mi-9*, localizados nos cromossomos 6 e 12, ou em ‘loci’ ainda não caracterizados. Alguns desses genes foram caracterizados como importantes por sua resistência à espécie *M. hapla* e efetivos em alta temperatura e/ou contra os isolados virulentos em acessos contendo o gene *Mi* (Veremis & Roberts, 1996b e Ammiraju *et al.*, 2003).

Sabe-se que durante o processo de melhoramento vários genes de resistência foram introgrididos em tomateiro provenientes de distintas fontes selvagens e um grande número destes genes tem sido mapeados no cromossomo 6, dentre eles *Mi* e *Ty-1* (Messeguer *et al.*, 1991 e Zamir *et al.*, 1994). Em alguns casos, estes genes parecem estar ligados em repulsão, como em *S. peruvianum* ‘PI 128657’, resistente a *Meloidogyne* spp. e suscetível a begomovírus (*Mi/Mi* e *ty-1/ty-1*) e *S. chilense* ‘LA-1969’, resistente a begomovírus e suscetível a *Meloidogyne* spp. (*mi/mi* e *Ty-1/Ty-1*) (Castro *et al.*, 2007), dificultando assim a obtenção de cultivares resistentes aos dois grupos de patógenos.

Neste contexto, a identificação de fontes de resistência com amplo espectro e simultânea a estes dois grupos de patógenos é importante em trabalhos de melhoramento do tomateiro, especialmente em regiões tropicais. O presente trabalho teve como objetivo identificar novas fontes de resistência a estes dois grupos de patógenos com resistência ampla e simultânea a begomovírus monopartidos e bipartidos, e a diferentes espécies de *Meloidogyne* em acessos selvagens e cultivados de uma coleção representativa de espécies de *Solanum* (Seção *Lycopersicon*).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Germoplasma de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) avaliado simultaneamente para begomovírus bipartidos e espécies de *Meloidogyne* no Brasil** - Este ensaio foi conduzido na área experimental da Embrapa Hortaliças - CNPH onde uma amostra do Banco de

Germoplasma foi avaliada simultaneamente para resistência a begomovírus e *Meloidogyne* spp. Foram avaliados 71 acessos de *Solanum* (46 *S. peruvianum*, nove *S. pimpinellifolium*, seis *S. lycopersicum*, cinco *S. habrochaites*, dois *S. chilense*, um de *S. corneliomuelleri* e dois híbridos interespecíficos entre *S. lycopersicum* x *S. peruvianum*) (Tabela 1). As sementes dos acessos das espécies selvagens germinaram de maneira errática. Desta forma, o número de plantas avaliadas foi variável entre os acessos. Os controles utilizados foram *S. lycopersicum* cultivar ‘Viradoro’ (suscetível a begomovírus e resistente a nematóides do gênero *Meloidogyne* devido à presença do gene *Mi*) e a linhagem ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus devido ao gene *tcm-1* e suscetível a *Meloidogyne* spp.) (Giordano *et al.*, 2005b e García-Cano *et al.*, 2008). Plantas dos acessos testados e usados como controles foram inoculadas 20 dias após a semeadura com 6.000 ovos e juvenis de nematóides por planta com uma população mista de *M. incognita* e *M. javanica* e posteriormente inoculados via exposição em casa-de-vegetação (durante dez dias) a uma alta população de moscas-brancas virulíferas. Os acessos foram transplantados 34 dias após semeadura, para campo naturalmente infestado com uma mistura de populações das espécies *M. incognita* e *M. javanica* e submetidos à inoculação natural com begomovírus por *B. tabaci*. As avaliações para begomovírus foram feitas 30 dias após o transplante com base em uma escala visual de notas variando de 1-4 (1 = ausência de sintomas e 4 = nanismo severo e clorose internerval (plantas com notas de 2 a 4 foram consideradas suscetíveis). Amostras foliares de acessos com notas entre 1 e 2 foram avaliadas para a presença de DNA viral por meio de PCR conforme descrito posteriormente. A avaliação para nematóides foi feita ao final do ciclo (aproximadamente 100 dias após transplante) mediante análise visual da presença ou ausência de galhas.

**Deteção da presença viral em plantas inoculadas** - O DNA genômico das plantas foi extraído a partir de folhas jovens coletadas de cada indivíduo, segundo protocolo modificado CTAB (Boiteux *et al.*, 1999). Em alguns casos, foi realizada a análise conjunta composta de DNA extraído de diferentes plantas dentro de cada acesso. A qualidade do DNA foi monitorada por eletroforese, em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. O segmento foi amplificado usando ‘primers’ degenerados: PAL1v1978 (5'-GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTTYCCNGT-3') e PARc715 (5'-

GATTCTGCAGTTDATRRTTYTCRTCCATCCA-3'), que têm sido amplamente empregados para detecção universal de espécies de *Begomovirus* (Rojas *et al.*, 1993). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 12,5 µl contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, 250 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,8 µM de cada 'primer', uma unidade da enzima Taq polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador (Gene AmpR PCR System 9700) programado para um ciclo de 94° C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 30 segundos a 94° C, 60 segundos a 50° C e 3 minutos a 72° C, seguido de uma extensão final de 7 minutos a 72° C e finalmente a temperatura foi reduzida para 4° C. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,2%. Seis amostras positivas para a presença do vírus foram submetidas ao sequenciamento genético para a confirmação da espécie viral.

**Acessos avaliados para begomovírus monopartidos na Espanha** - Este ensaio foi conduzido na área da Estação Experimental de 'La Mayora' (Algarrobo Costa, Espanha) em casa-de-vegetação. Foram selecionados 17 acessos que apresentaram resistência simultânea a begomovírus bipartidos e com reação do tipo imunidade ou com reduzido número de galhas de *Meloidogyne* spp. (Tabela 2). O acesso 'CNPH 416' que se mostrou resistente a ToRMV e suscetível às espécies de *Meloidogyne* também foi incluído na avaliação. Os controles empregados foram 'TX-468-RG' (resistente) e 'Moneymaker' (MM) (suscetível). Trinta plantas de cada acesso foram inoculadas via *Agrobacterium tumefaciens* (García-Cano *et al.*, 2008) com duas espécies de *Begomovirus* monopartidos (Tabela 2). As plantas foram inoculadas no estágio de 3-4 folhas verdadeiras com três clones infectivos de espécies associadas ao 'complexo viral TYLCD', *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*-Spain TYLCV-ES (ES:Mur1:92); *Tomato yellow leaf curl virus*- Israel TYLCV-IL (ES:ALm:99) e *Tomato yellow leaf curl virus*-Mild TYLCV-Mld (ES:72:97) utilizando-se dez plantas para cada espécie viral. Para TYLCV-IL, as plantas foram também expostas à alta população virulífera de *B. tabaci* em casa-de-vegetação. O acesso 'CNPH 416' foi avaliado apenas para o TYLCV-IL, via inoculação por *A. tumefaciens* e inoculação natural por *B. tabaci*.

As plantas inoculadas foram avaliadas aos 17 e 30 dias após inoculação (dai) mediante escala de notas de 0-5 (Lapidot *et al.*, 2006) e a presença de DNA viral foi

detectada via hibridização molecular (Accotto *et al.*, 2000). Para detecção viral, a segunda ou terceira folha a partir do ápice foi removida e os ácidos nucléicos totais imobilizados em membranas de náilon carregadas positivamente (Nylon<sup>+</sup>, Roche Diagnostics). Plantas de tomate sadio e plantas da cultivar ‘Moneymaker’ (suscetível) foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os ácidos nucléicos das amostras foram fixados à membrana mediante tratamento com luz ultravioleta (Crosslinker, mod. RPN 2500, Amersham Life Science) e as membranas foram hibridizadas com sondas de DNA marcado com digoxigenina específicas para a região intergênica de TYLCV-IL e sonda mista no caso de TYLCSV-ES e TYLCV-Mld. O procedimento de hibridização e detecção por quimioluminescência foi realizado seguindo o protocolo de Roche Diagnostics (‘DNA labelling and detection kit’). As membranas foram lavadas e expostas a filme de raio-X em diferentes tempos de exposição.

## RESULTADOS

### **Identificação do isolado de begomovírus empregado na avaliação conduzida no Brasil -**

Análise das sequências indicou que o isolado utilizado nos testes de resistência no Brasil representava uma variante do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Análise de plantas controle de ‘Viradoro’ infectadas apenas em condição de inóculo natural também indicou a presença predominante de ToRMV.

### **Reação dos acessos a begomovírus bipartidos e espécies de *Meloidogyne* no Brasil -**

Nos ensaios conduzidos no Brasil, a cultivar ‘Viradoro’ apresentou 100% de plantas com sintomas severos de infecção por begomovírus e resistência à espécies de *Meloidogyne*. Por sua vez, o controle ‘TX-468-RG’ apresentou resistência ao ToRMV e sintomas severos de infecção por *Meloidogyne* spp. (Figura 1). Estes resultados indicaram que a pressão de inóculo e as condições ambientais foram adequadas para a expressão dos sintomas dos dois grupos de patógenos. Para reação ao ToRMV, fontes de resistência foram observadas em 22 acessos (englobando espécies de *S. chilense*, *S. cornelliomuelleri*, *S. habrochaites* e *S. peruvianum*), que apresentaram níveis de resistência similares ao controle resistente ‘TX-468-RG’ (média inferior a 1,35). Todos estes acessos podem ser considerados fontes alternativas de resistência para ToRMV.

**Acessos com resistência simultânea a patógenos dos gêneros *Begomovirus* e *Meloidogyne* spp.** - Acessos resistentes à população mista de nematóides e que obtiveram médias de sintomas abaixo de 1,1 para o begomovírus bipartido (ToRMV) foram considerados resistentes aos dois grupos de patógenos e encontram-se listados na Tabela 2. Foram observados nesta categoria apenas acessos das espécies *S. peruvianum* e *S. cornelliomuelleri*. É interessante mencionar que o acesso ‘CNPH 0515’ (geração S4) derivado de cruzamentos interespecíficos com *S. lycopersicum* apresentou plantas com elevada resistência ao ToRMV e as duas espécies de *Meloidogyne incognita* e *javanica*.

**Acessos avaliados para begomovírus monopartidos na Espanha** - Nenhum dos acessos avaliados frente às três estirpes de *Begomovirus* mostrou sintomas aos 17 dai e a grande maioria permaneceu assintomática aos 30 dai. O resultado da avaliação dos acessos frente às espécies de *Begomovirus* monopartidos aos 30 dai encontra-se listado na **Tabela 3**. Seguindo a escala de notas de 1-5 (Lapidot *et al.*, 2006), plantas sintomáticas aos 30 dai, obtiveram 2,0 como nota máxima. Para TYLCV-Mld, as melhores respostas de resistência foram obtidas com os acessos de *S. peruvianum* ‘CNPH 1445’, ‘CNPH 1452’ e ‘CNPH 0101’ onde não foi observado nenhum resultado positivo em hibridização molecular. Em contraste, os acessos ‘CNPH 1439’, ‘CNPH 1463’, ‘CNPH 938’ e ‘CNPH 1467’, também todos de *S. peruvianum*, mostraram 11% a 33% de plantas com sintomas entre 1 e 2 e hibridização positiva de 11% a 83% dos casos. Detecção viral por hibridização molecular foi observada em três plantas de ‘CNPH 1194’ aos 17 dai, entretanto, aos 30 dai o resultado obtido foi negativo, à semelhança do que pode ocorrer com ‘TX-468-RG’ (García-Cano *et al.*, 2008). Nos demais acessos avaliados e que foram assintomáticos, observou-se variação de 11% a 67% de plantas positivas por hibridização molecular (Tabela 3). Com relação à TYLCV-ES, todas as plantas avaliadas dos acessos de *S. peruvianum* ‘CNPH 1445’ (sete plantas) e ‘CNPH 1463’ (dez plantas) foram negativas em hibridização molecular. O acesso de *S. peruvianum* ‘CNPH 1439’ mostrou duas plantas com sintomas de 1 e 1,5, enquanto os demais, apesar de assintomáticos, apresentaram entre 10 a 71% de plantas infectadas. Detecção viral por hibridização molecular foi observada em duas plantas de ‘CNPH 1194’ aos 17 dai, entretanto, aos 30 dai o resultado obtido foi negativo à semelhança do que

ocorreu em plantas inoculadas com TYLCV-Mld. Dentre os acessos avaliados para TYLCV-IL, em *S. peruvianum* ‘CNPH 1445’, ‘CNPH 1194’, ‘CNPH 101’, ‘CNPH1469’ e ‘CNPH 1453’, aos 30 dai, não foi detectado vírus em nenhuma das plantas avaliadas. Sintomas foram observados apenas em *S. peruvianum* ‘CNPH 0938’, os outros acessos apresentaram de uma a nove plantas infectadas mediante hibridização molecular (Tabela 3). O acesso ‘CNPH 416’ apresentou alto nível de resistência a TYLCV-IL não mostrando sintomas em nenhuma das 10 plantas avaliadas e nem acumulação viral.

## DISCUSSÃO

As viroses causadas por espécies de *Begomovirus* constituem atualmente um dos mais sérios problemas na cultura de tomate no Brasil e no mundo. Outro problema responsável por perdas na produção da cultura refere-se ao ataque por espécies do gênero *Meloidogyne*. Para contornar estes problemas, programas de melhoramento têm buscado desenvolver cultivares resistentes, usando como estratégias principais a busca de fontes de amplo espectro de resistência para posterior introgressão dos genes de interesse na espécie cultivada *S. lycopersicum* e/ou a incorporação (‘piramidização’) destes diferentes genes de resistência em linhas elites (Vidavski *et al.*, 2008).

Para begomovírus fontes de resistência têm sido identificadas principalmente em germoplasma de espécies selvagens incluindo *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense* e *S. pimpinellifolium* (Hassan *et al.*, 1984; Picó *et al.*, 1996; Picó *et al.*, 1999; Vidavski & Czosnek 1998; Ferreira *et al.*, 1999 e Santana *et al.*, 2001). Um grande número de genes de resistência tem sido mapeados no cromossomo 6 de tomate, entre os quais *Cf-2* e *Cf-5* para *Cladosporium fulvum* (Dixon *et al.*, 1996), *Ol-4* e *Ol-6* funcional frente a *Oidium neolyopersici* (Bai *et al.*, 2005), *Ty-3* e *Ty-1* para espécies de *Begomovirus* (Zamir *et al.*, 1994 e Ji *et al.*, 2007) e *Mi* a espécies de nematóides (Messeguer *et al.*, 1991 e Michelson *et al.*, 1994). *Ty-2*, outro gene que confere resistência a begomovírus, foi introgridido a partir de *S. habrochaites* e mapeado no cromossomo 11 (Hanson *et al.*, 2000 e Hanson *et al.*, 2006).

No presente trabalho, um grupo de acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças foi avaliado visando identificar novas fontes de resistência a espécies de

*Begomovirus* e de *Meloidogyne* spp. Com relação à begomovírus, baseando-se em sintomas, um grande número de acessos foi encontrado mostrando resistência a ToRMV (média de 1,1) sendo um *S. chilense* ('CNPH 0410'), um *S. corneliomuelleri* ('CNPH 1033'), dois *S. habrochaites* ('CNPH 0416' e 'CNPH 0420') e 18 *S. peruvianum* (Tabela 1). A análise da acumulação viral nos tecidos das plantas inoculadas foi feita mediante PCR. Em 'CNPH 0420' não se detectou nenhuma planta positiva do total de 5. Em 'CNPH 0410' detectou-se apenas uma planta positiva no total de 25, enquanto em plantas dos acessos de *S. peruvianum* 'CNPH 1452' e 'CNPH 1453' detectou-se uma e duas plantas positivas do total de oito e 12, respectivamente. A resistência observada aqui pode existir em um ou dois níveis: à entrada do patógeno (referente à eficiência de transmissão do vírus pelo vetor, o que implica em fatores de resistência ao vetor) e/ou à infecção local e/ou sistêmica. A técnica de seleção de fontes de resistência empregada neste trabalho não discrimina entre os dois tipos de resistência, entretanto, serve como primeiro passo na identificação de acessos para estudos adicionais em programas de melhoramento envolvendo inoculações mediante enxertia, biobalística, agroinoculação ou também através de ensaios de inoculação controlada com *B. tabaci* (Seal *et al.*, 2006).

Com relação a nematóides, um grande número de acessos resistentes foi identificado principalmente, em *S. peruvianum*, assim como encontrado por Ammati *et al.* (1985) e Veremis & Roberts (1996a). O gene *Mi*, proveniente de *S. peruvianum* 'PI 128657' (Bailey 1941), foi introgridido em *S. lycopersicum* através de resgate de embriões (Smith, 1944), onde uma única planta F<sub>1</sub> foi retrocruzada com *S. lycopersicum* resultando no desenvolvimento de duas cultivares ('Anahu' e 'VFN8') que serviram de base em programas de melhoramento para parentais doadores do 'locus' *Mi* para todas as cultivares e híbridos comerciais atualmente disponíveis.

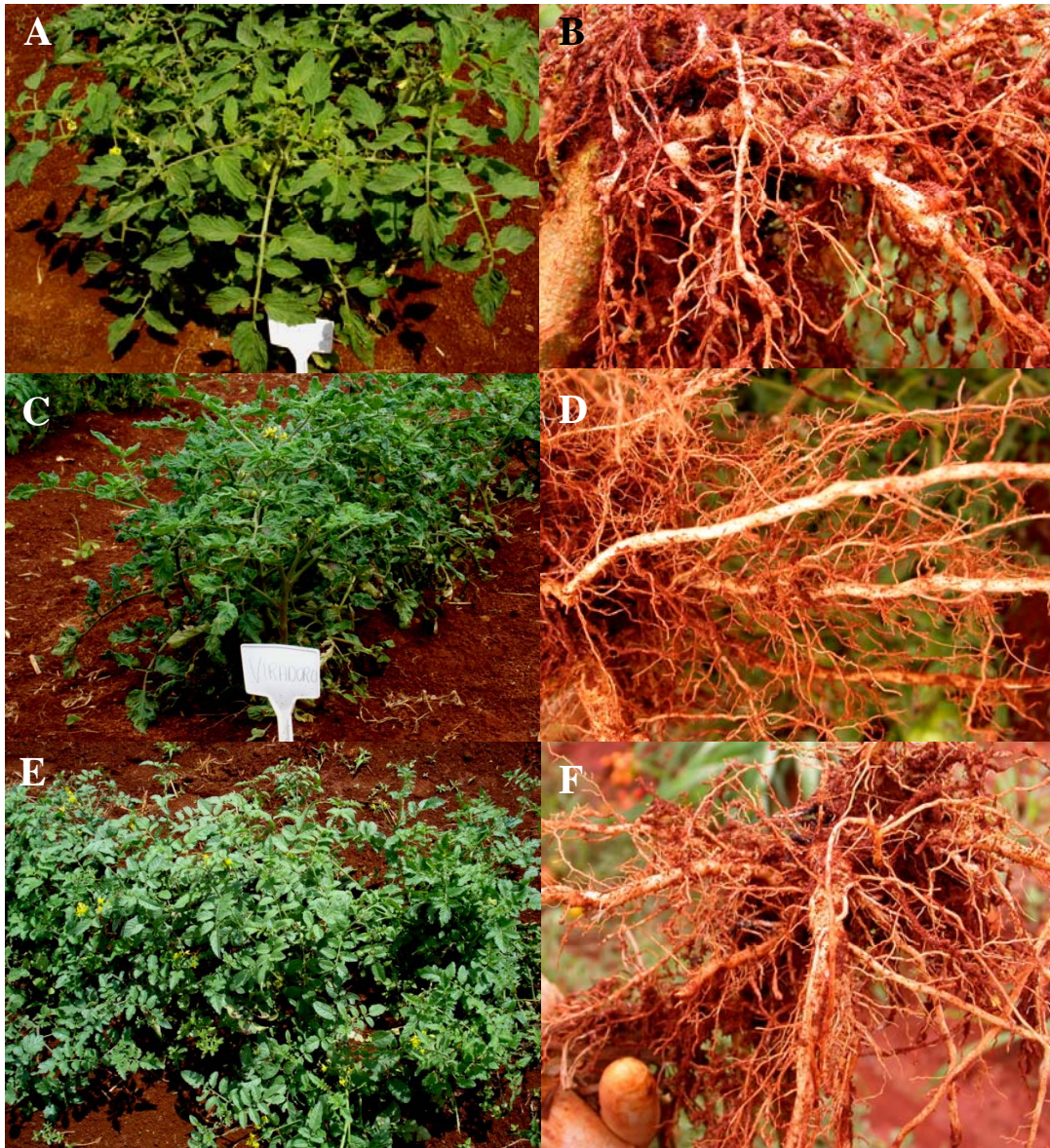
Vários marcadores ligados a *Mi* foram identificados nos últimos anos (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991 e Messeguer *et al.*, 1991) contribuindo com programas de melhoramento no sentido de acelerar o processo de seleção de genótipos resistentes, bem como servir como referência para localização de outros genes. O 'locus' *Ty-1*, proveniente de *S. chilense* 'LA-1969', confere resistência a begomovírus monopartidos e bipartidos (Boiteux *et al.* 2007) e foi mapeado na região entre TG297 e TG97 bem próximo de *Mi* (Zamir *et al.*, 1994). Desta forma, marcadores para o gene *Mi* poderiam auxiliar como

marcador para Ty-1 se os alelos das espécies em questão diferirem para estes marcadores. De acordo com Castro *et al.* (2007) em alguns acessos, *Mi* e Ty-1 podem estar ligados em fase de repulsão. Isto ocorre no acesso *S. peruvianum* 'PI 128657', que é resistente a espécies de *Meloidogyne* spp. e suscetível a espécies de *Begomovirus* (*Mi/Mi* e *ty-1/ty-1*), enquanto que *S. chilense* 'LA-1969' é resistente a begomovírus e suscetível a *Meloidogyne* spp. (*mi/mi* e *Ty-1/Ty-1*).

Neste trabalho, embora não tenha sido verificado o genótipo dos acessos avaliados, observou-se fenótipo semelhante em alguns acessos. *Solanum chilense* 'CNPH 0410' mostrou-se extremamente resistente a ToRMV e altamente suscetível a infecção por espécies de *Meloidogyne*. Comportamento similar foi observado em plantas dos acessos da espécie *S. habrochaites* 'CNPH 0420', 'CNPH 0421' e 'CNPH 0423'. Reação oposta, ou seja, extrema resistência a *Meloidogyne* spp e suscetibilidade a begomovírus foi observado em alguns acessos de *S. peruvianum* tais como 'CNPH 0782', 'CNPH 1435' e 'CNPH 1436', indicando variabilidade desta região genômica ou a presença de outros genes e/ou alelos nestes acessos. Os acessos que mostraram resistência simultânea aos dois grupos de patógenos nas condições brasileiras constituem fontes de variabilidade genética potencialmente importantes para programas de melhoramento genético do tomateiro. Por esta razão, estes acessos foram também avaliados contra espécies de *Begomovirus* monopartidos buscando resistência ampla. Os resultados com as espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido confirmaram, em parte, os resultados obtidos com ToRMV no Brasil. A maioria dos acessos avaliados para monopartidos não apresentou sintomas aos 30 dai. Plantas sintomáticas foram observadas apenas nos acessos 'CNPH 0938', 'CNPH 1439', 'CNPH 1463' e 'CNPH 1467', no entanto, com sintomas suaves quando comparados ao controle suscetível. Os resultados mais promissores foram obtidos com os acessos de *S. peruvianum* 'CNPH 1194' e 'CNPH 1445', onde não foram detectados sintomas e nenhum sinal de acumulação de DNA das espécies virais inoculadas. Os acessos 'CNPH 1463'; 'CNPH 1469'; 'CNPH 1452' e 'CNPH 0101' também se mostraram promissores no controle de begomovírus apresentando alto nível de resistência frente as espécies. Os acessos 'CNPH 0416' e 'CNPH 1453', testados apenas para a espécie TYLCV-IL, não acumularam vírus, podendo ser incluídos em estudos posteriores contra as outras duas espécies.



Em conclusão, os resultados obtidos mostram claramente uma elevada diversidade de determinantes genéticos de resistência a begomovírus bipartidos e monopartidos no gênero *Solanum* (Seção *Lycopersicon*). O complexo específico *S. peruvianum* mostrou uma elevada frequência de acessos resistentes a begomovírus e, conforme já conhecido, a *M. javanica* e *M. incognita*. Devido à resistência ampla apresentada, muitos destes acessos são promissores para utilização em programas de melhoramento genético. No nosso estudo merecem destaque especial os acessos de *S. peruvianum* ‘CNPH 0101’; ‘CNPH 1194’; ‘CNPH 1445’, que combinaram resistência a begomovírus bipartidos e monopartidos e nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. Nestes acessos, esforços devem ser concentrados para promover a introgressão de genes via resgate de embrião após cruzamentos interespecíficos. Estudos adicionais devem também ser conduzidos com plantas individuais dentro do acesso ‘CNPH 0515’ (geração S4 derivado de cruzamentos interespecíficos com *S. lycopersicum*) que apresentou plantas com elevada resistência ao ToRMV e às duas espécies de *Meloidogyne*. Neste acesso, a barreira de cruzamento já foi superada e a obtenção de linhagens puras permitirá diversos estudos de herança, alelismo e ligação com outras fontes de resistência disponíveis para os programas de melhoramento genético do tomateiro.



**Figura 1** - Reação de acessos de diferentes espécies de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) a *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. Controles e acessos foram inoculados com 6.000 ovos e juvenis em condição de casa-de-vegetação e inoculados via mosca-branca com ToRMV e foram posteriormente transplantados para campo naturalmente infestado com *M. incognita* e *M. javanica* e com presença de mosca-branca. **Fig. 1A-1B** - *S. lycopersicum* 'TX-468-RG' (resistente a ToRMV e suscetível a *Meloidogyne* spp.); **Fig. 1C-1D** - *S. lycopersicum* 'Viradoro' (suscetível a ToRMV e resistente a *Meloidogyne* spp.); **Fig. 1E-1F** - *S. peruvianum* 'CNPH 0101' com resistência simultânea a ToRMV e *Meloidogyne* spp.

**Tabela 1** - Avaliação da reação de *Solanum* spp. ao begomovírus bipartido *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e uma população mista de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*.

| Espécie de <i>Solanum</i><br>(seção<br><i>Lycopersicon</i> ) | Acesso      | Número de<br>plantas<br>avaliadas | Média<br>ToRMV | Amplitude da<br>Variação<br>ToRMV | Reação a<br>ToRMV | Número de plantas<br>sem sintomas de<br><i>Meloidogyne</i> / total | Reação a<br><i>Meloidogyne</i> |
|--|-------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|-------------------|--|--------------------------------|
| <i>S. lycopersicum</i>                                       | 'TX-468-RG' | 34                                | 1,35           | 1,0-2,0                           | R*                | 00/34  | S**                            |
| <i>S. lycopersicum</i>                                       | Viradoro    | 44                                | 3,78           | 3,2-4,0                           | S                 | 43/44  | R                              |
| <i>S. lycopersicum</i>                                       | 0043        | 11                                | 3,59           | 2,5-4,0                           | S                 | 00/11  | S                              |
| <i>S. lycopersicum</i>                                       | 0046        | 15                                | 3,43           | 3,0-4,0                           | S                 | 00/14  | S                              |
| <i>S. lycopersicum</i>                                       | 0095        | 18                                | 2,51           | 1,2-4,0                           | S                 | 00/17  | S                              |
| <i>S. lycopersicum</i>                                       | 0202        | 16                                | 3,00           | 1,5-4,0                           | S                 | 00/16  | S                              |
| <i>S. lycopersicum</i>                                       | 0457        | 07                                | 1,97           | 1,0-2,5                           | S                 | 00/07  | S                              |
| <i>S. lycopersicum</i>                                       | 1478        | 01                                | 2,88           | 2,7-3,0                           | S                 | 00/01  | S                              |
| <i>S. chilense</i>   | 0410        | 26                                | 1,15           | 1,0-2,0                           | R                 | 01/24  | S                              |
| <i>S. chilense</i>   | 0943        | 08                                | 1,66           | 1,2-3,0                           | S                 | 00/08  | S                              |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 0415        | 05                                | 3,38           | 2,7-4,0                           | S                 | 00/03  | S                              |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 0418        | 07                                | 3,25           | 2,7-4,0                           | S                 | 00/05  | S                              |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 0419        | 05                                | 2,13           | 1,5-3,0                           | S                 | 00/05  | S                              |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 0597        | 05                                | 2,43           | 1,5-4,0                           | S                 | 00/05  | S                              |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 0769        | 04                                | 1,75           | 1,0-2,0                           | S                 | 04/04  | R                              |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 0789        | 22                                | 1,75           | 1,0-3,0                           | S                 | 02/18  | V***                           |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 0790        | 01                                | 1,75           | 1,5-2,0                           | S                 | 01/01  | R                              |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 0924        | 06                                | 1,32           | 1,0-1,5                           | S                 | 00/06  | S                              |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                                   | 1195        | 08                                | 1,57           | 1,0-2,5                           | S                 | 08/08  | S                              |
| <i>S. corneliomuelleri</i>                                   | 1033        | 01                                | 1,00           | 1,00                              | R                 | 01/01  | R                              |
| <i>S. habrochaites</i>                                       | 0416        | 20                                | 1,14           | 1,0- 2,0                          | R                 | 02/20  | V                              |
| <i>S. habrochaites</i>                                       | 0420        | 05                                | 1,00           | 1,00                              | R                 | 00/05  | S                              |
| <i>S. habrochaites</i>                                       | 0421        | 03                                | 1,17           | 1,0-1,5                           | R                 | 00/03  | S                              |
| <i>S. habrochaites</i>                                       | 0423        | 06                                | 1,19           | 1,0-2,2                           | R                 | 00/05  | S                              |
| <i>S. habrochaites</i>                                       | 1034        | 05                                | 1,17           | 1,0-1,5                           | R                 | 05/05  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0101        | 08                                | 1,05           | 1,0-1,5                           | R                 | 08/08  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0782        | 06                                | 1,75           | 1,0-2,5                           | S                 | 06/06  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0783        | 18                                | 1,28           | 1,0-2,0                           | R                 | 16/16  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0785        | 16                                | 1,13           | 1,0-1,5                           | R                 | 07/07  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0786        | 06                                | 1,46           | 1,0-1,5                           | S                 | 06/06  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0787        | 08                                | 1,23           | 1,0-2,5                           | S                 | 08/08  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0798        | 30                                | 1,27           | 1,0-2,5                           | R                 | 28/28  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0931        | 10                                | 1,45           | 1,0-2,0                           | S                 | 10/10  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0933        | 26                                | 1,38           | 1,0-3,0                           | R                 | 26/26  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0934        | 01                                | 1,25           | 1,0-1,5                           | S                 | 01/01  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0936        | 30                                | 1,80           | 1,0-3,0                           | R                 | 30/30  | R                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0938        | 04                                | 1,00           | 1,00                              | R                 | 03/04  | V                              |
| <i>S. peruvianum</i>   | 0939        | 05                                | 1,73           | 1,0-2,5                           | S                 | 05/05  | R                              |

|                                |      |    |      |         |   |       |   |
|--------------------------------|------|----|------|---------|---|-------|---|
| <i>S. peruvianum</i>           | 1194 | 07 | 1,04 | 1,0-2,0 | R | 07/07 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1277 | 05 | 1,05 | 1,0-1,5 | R | 04/04 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1434 | 38 | 1,07 | 1,0-2,5 | R | 24/38 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1435 | 21 | 1,67 | 1,0-3,0 | S | 09/09 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1436 | 10 | 1,66 | 1,0-3,0 | S | 10/10 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1438 | 36 | 1,23 | 1,0-3,0 | R | 33/33 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1439 | 36 | 1,13 | 1,0-3,5 | R | 33/36 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1440 | 45 | 1,20 | 1,0-2,0 | S | 22/42 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1443 | 06 | 1,33 | 1,0-1,5 | S | 02/06 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1444 | 28 | 1,50 | 1,0-3,0 | R | 25/26 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1445 | 24 | 1,11 | 1,0-1,7 | R | 23/23 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1446 | 18 | 1,00 | 1,0-2,5 | R | 18/18 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1447 | 01 | 1,63 | 1,2-2,0 | S | 01/01 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1448 | 15 | 1,13 | 1,0-1,5 | R | 13/13 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1449 | 05 | 1,30 | 1,0-1,7 | S | 00/05 | S |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1450 | 07 | 1,17 | 1,0-2,0 | R | 02/02 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1452 | 25 | 1,10 | 1,0-2,0 | R | 21/25 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1453 | 21 | 1,06 | 1,0-2,0 | R | 21/21 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1456 | 02 | 1,50 | 1,0-2,0 | S | 02/02 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1459 | 36 | 1,35 | 1,0-3,0 | S | 04/33 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1460 | 01 | 1,00 | 1,00    | R | 01/01 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1461 | 22 | 1,31 | 1,0-3,0 | R | 12/21 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1462 | 14 | 1,13 | 1,0-2,5 | R | 12/14 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1463 | 13 | 1,00 | 1,0-1,0 | R | 13/13 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1464 | 18 | 1,27 | 1,0-2,5 | R | 13/13 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1465 | 21 | 1,33 | 1,0-3,0 | R | 18/20 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1466 | 07 | 1,40 | 1,0-2,0 | S | 07/07 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1467 | 04 | 1,03 | 1,0-1,2 | R | 03/03 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1468 | 23 | 1,32 | 1,0-2,5 | S | 20/23 | V |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1469 | 22 | 1,05 | 1,0-1,5 | R | 12/12 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1470 | 12 | 1,48 | 1,0-2,0 | S | 12/12 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1471 | 29 | 1,08 | 1,0-1,5 | R | 27/27 | R |
| <i>S. peruvianum</i>           | 1472 | 09 | 1,63 | 1,0-2,2 | S | 02/09 | V |
| ( <i>S. lyco x S. per</i> ) F4 | 513  | 05 | 1,25 | 1,0-1,5 | R | 00/04 | S |
| ( <i>S. lyco x S. per</i> ) F4 | 515  | 07 | 1,42 | 1,0-2,5 | R | 07/07 | R |

\*R: Plantas resistentes, \*\* S: Plantas suscetíveis e \*\*\* V: Plantas segregantes para o caráter avaliado.

**Tabela 2** - Grupo de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) identificados com resistência simultânea a *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e a uma população mista de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*.

| <b>Espécies de<br/><i>Solanum</i> (seção<br/><i>Lycopersicon</i>)</b> | <b>Código dos acessos</b>  | <b>Média para<br/>ISS*</b> | <b>Total de<br/>Acessos</b> |
|---|--|----------------------------|-----------------------------|
| <i>S. corneliomuelleri</i>  | ‘CNPH 1033’  | 1,0                        | 01                          |
| <i>S. peruvianum</i>  | ‘CNPH 0938’**;<br>‘CNPH 1194’;<br>‘CNPH 1277’;<br>‘CNPH 1446’;<br>‘CNPH 1460’;<br>‘CNPH 1463’;<br>‘CNPH 1467’.                                   | 1,0                        | 07                          |
| <i>S. peruvianum</i>  | ‘CNPH 0101’;<br>‘CNPH 0785’;<br>‘CNPH 1439’**;<br>‘CNPH 1445’;<br>‘CNPH 1448’;<br>‘CNPH 1452’**;<br>‘CNPH 1453’;<br>‘CNPH 1469’;<br>‘CNPH 1471’. | 1,1                        | 09                          |

\*ISS: Índice de severidade de sintomas: (1) = ausência de sintomas, (2) = amarelecimento e mosaico dos folíolos, (3) = mosaico, enrugamento dos folíolos, clorose internerval e epinastia e (4) = mosaico, enrugamento severo e nanismo.

\*\*Para nematóides: acessos: CNPH 938 (uma planta S de 4); CNPH1439 (três plantas S de 36) e CNPH 1452 (quatro plantas S de 25)

**Tabela 3** - Avaliação de acessos de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) frente à *Tomato yellow leaf curl virus*-Mild (TYLCV-Mld) e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*-Spain (TYLCSV-ES) após inoculação via *Agrobacterium* e *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL) por inoculação via *Agrobacterium* e infecção natural por *Bemisia tabaci*. Avaliação conduzida aos 30 dias após inoculação.

| Acessos                | TYLCV-Mld<br>PS/TI <sup>1</sup> | TYLCV-Mld<br>PI/TI <sup>2</sup> | TYLCSV-<br>ES PS/TI | TYLCSV-ES<br>PI/TI | TYLCV-IL<br>PS/TI | TYLCV-IL<br>PI/TI |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| CNPH 0416 <sup>3</sup> | ---                             | ---                             | ---                 | ---                | 00/10             | 00/10             |
| CNPH 1445              | 00/08                           | 00/08                           | 00/07               | 00/07              | 00/09             | 00/09             |
| CNPH 1033              | 00/10                           | 02/10                           | 00/07               | 05/07              | 00/10             | 09/10             |
| CNPH 1452              | 00/08                           | 00/08                           | 00/07               | 01/07              | 00/10             | 02/10             |
| CNPH 1439              | 02/09                           | 06/09                           | 02/10               | 06/10              | 00/10             | 07/10             |
| CNPH 1469              | 00/09                           | 01/09                           | 00/10               | 01/10              | 00/10             | 00/10             |
| CNPH 0785              | 00/06                           | 01/06                           | 00/10               | 01/10              | 00/09             | 01/09             |
| CNPH 1277              | 00/10                           | 04/10                           | 00/05               | 01/05              | 00/10             | 04/10             |
| CNPH 1463              | 01/09                           | 01/09                           | 00/10               | 00/10              | 00/09             | 01/09             |
| CNPH 0938              | 02/06                           | 05/06                           | 00/08               | 03/08              | 04/10             | 06/10             |
| CNPH 1194              | 00/10                           | 00/10                           | 00/10               | 00/10              | 00/10             | 00/10             |
| CNPH 0101              | 00/09                           | 00/09                           | 00/07               | 01/07              | 00/10             | 00/10             |
| CNPH 1467              | 01/09                           | 06/09                           | 00/06               | 02/06              | 00/09             | 09/09             |
| CNPH 1471              | 00/09                           | 05/09                           | 00/10               | 03/10              | 00/10             | 05/10             |
| CNPH 1460              | 00/09                           | 06/09                           | 00/03               | 01/03              | 00/09             | 06/09             |
| CNPH 1446              | 00/10                           | 06/10                           | 00/07               | 05/07              | 00/09             | 06/09             |
| CNPH 1448              | 00/08                           | 03/08                           | 00/06               | 01/06              | 00/09             | 06/09             |
| CNPH 1453 <sup>3</sup> | ---                             | ---                             | ---                 | ---                | 00/09             | 00/09             |
| ‘Moneymaker’           | 03/04                           | 03/04                           | 03/03               | 03/03              | 05/05             | 05/05             |
| ‘TX 468-RG’            | 00/04                           | 00/04                           | 00/04               | 00/04              | 00/04             | 00/04             |

<sup>1</sup>PS/TI: Plantas sintomáticas/total de plantas inoculadas.

<sup>2</sup>PI/TI: Plantas infectadas/total de plantas inoculadas.

<sup>3</sup>Sementes não disponíveis.

## CAPÍTULO 4

### **Níveis de resistência de acessos de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) a *Bemisia tabaci* biótipo B e efeitos na eficiência de transmissão de espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido**

Rita de Cássia Pereira-Carvalho<sup>1,3</sup>; Patrícia A. Gomes<sup>1,2</sup>; Geni L. Villas Bôas<sup>1</sup>; Maria Esther N. Fonseca<sup>1</sup>; Alice K. Inoue-Nagata<sup>1,3</sup>; Renato O. Resende<sup>3</sup>; Leonardo S. Boiteux<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970, Brasília-DF, Brasil; <sup>2</sup>Faculdade da Terra de Brasília (FTB), 72610-300, Brasília-DF; <sup>3</sup>UnB - Departamentos de Fitopatologia e de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília-DF, Brasil;

<sup>4</sup>Bolsista de Produtividade em Pesquisa CNPq (MCT).

## RESUMO

O cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no Brasil tem sido severamente afetado por espécies de *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B. A mosca-branca também é um importante inseto-praga responsável por perdas quantitativas e qualitativas no tomateiro. Diversos acessos de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) foram identificados com resistência à *B. tabaci* biótipo B e/ou a espécies de begomovírus. No entanto, são escassas as informações sobre a influência da interação planta-inseto nas respostas diferenciadas a begomovírus observadas em acessos resistentes à *B. tabaci* biótipo B. Oito acessos de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) foram avaliados quanto à resposta a uma população de mosca-branca, usando como critérios o número de ovos e o número de pupas presentes em amostras foliares. Estes mesmos acessos foram avaliados para resistência a begomovírus em casa-de-vegetação em dois ensaios independentes. Os acessos foram inoculados via exposição a alta pressão de moscas-brancas virulíferas com isolados de Tomato mottle leaf curl virus e uma outra espécie de begomovírus bipartido. Em ambos os ensaios, as plantas foram avaliadas usando uma escala de severidade da doença variando de 1 (resistente) a 4 (suscetível). No primeiro ensaio, foi anotada a incidência (%) de plantas com infecção viral sistêmica usando análise via PCR com ‘primers’ específicos para begomovírus. No segundo ensaio, a acumulação viral foi analisada via hibridização molecular com sonda específica para o componente genômico DNA-A. O controle suscetível ‘Viradoro’ apresentou 100% de plantas com sintomas de begomovírus e intensa colonização por mosca-branca (69 ovos por 1,4 cm<sup>2</sup> de folíolo). O acesso *Solanum pennelli* ‘LA 716’ apresentou os mais elevados níveis de resistência à mosca-branca (0,4 ovos) e apenas 14% de plantas mostraram sintomas de infecção por begomovírus. A reduzida frequência de plantas sintomáticas de ‘LA 716’ pode estar associada à presença de exsudatos produzidos por tricomas tipo IV impedindo a oviposição e a transmissão viral. Os acessos de *S. habrochaites* ‘PI-134417’, ‘PI-134418’ e os acessos ‘PI-126445’ e ‘PI 127827’ apresentaram colonização mais intensa por mosca-branca (contagem de ovos variando de 32,6 a 91,3) e com frequência de plantas com infecção sistêmica variando entre 3,85% a 70,6%. A linhagem *S. lycopersicum* ‘TX-468-RG’ mostrou-se tolerante à infecção, mas foi suscetível à colonização pela mosca-branca.



*Solanum chilense* ‘LA-1967’ e ‘PI-127827’ foram colonizados pela mosca-branca, no entanto, foram os dois acessos de melhor desempenho em relação à resistência aos begomovírus nos dois ensaios. Os resultados indicam que o desenvolvimento de genótipos resistentes à *B. tabaci* biótipo B poderá resultar em menor incidência e severidade de begomovírus, sendo possível ‘piramidizar’ genes de resistência tanto ao vírus quanto à mosca-branca.

**Palavras-chave:** *Bemisia tabaci*, begomovírus, resistência, tomateiro.

### ABSTRACT

Severe economic losses have been observed on tomato (*Solanum lycopersicon* L.) in Brazil due to infection by whitefly-transmitted viral species belonging to the *Begomovirus* complex. Whitefly (*Bemisia tabaci* biotype B) is also an important pest of tomatoes, which very often causes both yield and quality constraints. Sources of resistance to whiteflies and/or *Begomovirus* species have been identified in *Solanum* spp. (section *Lycopersicon*) germplasm. However, no studies are available so far investigating the direct interference of insect resistance on virus resistance in *Solanum* spp. accessions. In this context, the present work was conducted in order to determine the impact of whitefly resistance on the transmission efficiency (incidence) and severity of symptoms induced by other bipartite *Begomovirus* species. In the first assay, eight *Solanum* spp. accessions were evaluated under greenhouse conditions for whitefly reaction in a bioassay. The average number of eggs and pupae present in leaf samples were evaluated. In a second assay, 15 day old plants from that same group of accessions were exposed (under controlled conditions) to viruliferous whiteflies during 14 days. Plants displaying begomovirus symptoms were evaluated using analysis by severity index, where: 1= no symptoms to 4 = severe symptoms. *Solanum lycopersicum* ‘Viradoro’ displayed high levels of whitefly infestation (69 eggs per 1.4 cm<sup>2</sup> of leaf tissue) with 100% of the plants exhibiting severe systemic virus symptoms. The accession *S. pennellii* ‘LA 716’ displayed the highest level of resistance to whiteflies colonization (0.4 eggs per 1.4 cm<sup>2</sup> of leaf tissue) and had only 14% of the plants displaying systemic begomovirus symptoms. The reduced frequency of plants with virus symptoms in this susceptible accession could be explained by the adult entrapment as well as antixenotic

effect of the exsudates produced by type IV trichomes, that difficult oviposition and might interfere with virus transmission. The *S. habrochaites* accessions ‘PI-134417’, ‘PI-134418’, ‘PI-126445’ and ‘PI-127827’ displayed a more intense whitefly oviposition (eggs per 1.4 cm<sup>2</sup> of leaf tissue ranging from 32.6 to 91.3) and variable frequency of systemic infected plants (12.5% a 70.5%). The *S. esculentum* line ‘TX-468-RG’, was tolerant to begomovirus (disease index = 1.7), but it was highly susceptible to whitefly colonization, indicating that the tolerance of this line is apparently not related to an interference of the plant with the vector. colocar resmumo *Solanum chilense* ‘LA-1967’ and ‘PI-127827’ accessions were infested by *B. tabaci*, but they were the accessions that displayed the highest resistance levels to this begomovirus in both assays. Overall, our results indicate that the deployment of resistance to whitefly derived from these *Lycopersicon* accessions could have a positive impact on minimizing losses due to begomovirus infection even in tomato cultivars susceptible to these viruses. In addition, it seems that is feasible to pyramidize resistance factors to both virus and its vector, into a single accession, which could result in a more stable and durable resistance to species belonging to the Brazilian begomovirus complex.

**Keywords:** *Bemisia tabaci*, begomovirus, tomato, resistance.

## INTRODUÇÃO

A mosca-branca *Bemisia tabaci* Genn. (família *Aleyrodidae*) apresenta ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada atualmente como uma das pragas mais destrutivas para a agricultura mundial (Bird & Maramorosch, 1978; Brown & Bird 1992; Perring *et al.*, 1993 e Polston & Anderson, 1999). *B. tabaci* pode causar danos diretos às plantas do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) através da sucção de seiva, favorecimento do desenvolvimento de fumaginas (espécies de *Capnodium*), indução do amadurecimento irregular e a ‘isoporização’ de frutos (Baldin *et al.*, 2005). No entanto, a importância econômica de *B. tabaci* reside no fato de que esse inseto é o vetor de diferentes espécies virais (Baldin *et al.*, 2005). De acordo com Jones (2003), 114 espécies de vírus são transmitidas por membros da família *Aleyrodidae*. Destas, 111 espécies são transmitidas por *B. tabaci*, sendo 6% em *Crinivirus* (*Closteroviridae*), 4% nos gêneros *Closterovirus* (*Closteroviridae*), *Ipomovirus* (*Potyviridae*) e *Carlavirus* (*Flexiviridae*) e 90% pertencem ao gênero *Begomovirus* (*Geminiviridae*).

No início da década de 1990, foi introduzido no Brasil um novo biótipo (*Bemisia tabaci* biótipo B) da mosca-branca (Lourenção & Nagai, 1994 e França *et al.*, 1996). Desde então, severos danos econômicos causados por begomovírus foram registrados em lavouras de tomate. Espécies de *Begomovirus* isolados no Brasil apresentam dois componentes (DNA-A e DNA-B) circulares, de fita simples com cerca de 2600 pares de bases cada um e encapsidados por uma proteína estrutural arranjada na forma de 22 capsômeros para formar dois icosaedros incompletos de 18 x 30 nm (Briddon & Markham, 1995). Os dois componentes não apresentam identidade de sequência, exceto por uma região comum (RC) de aproximadamente 200-250 pares de bases, que é altamente conservada para os dois componentes de uma mesma espécie viral.

*Bemisia tabaci* biótipo B apresenta hábito alimentar polífago com pelo menos 600 espécies de plantas hospedeiras em mais de 70 famílias, o que favoreceu sua rápida disseminação em todas as áreas produtoras de tomate para consumo *in natura* e para processamento industrial, contribuindo ainda para o aumento na diversidade de espécies de begomovírus presentes no país (Ribeiro *et al.*, 2003). Entre os anos de 2000 a 2006, foram observadas epidemias recorrentes e severas de ‘begomovirose’, resultando em grandes

prejuízos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, demandando a adoção de cultivares com resistência ao vírus, uma vez que em situação de infecção precoce, perdas de até 60% podem ocorrer em cultivares suscetíveis de tomate destinado ao processamento industrial (Giordano *et al.*, 2005a).

Devido à grande diversidade de espécies de *Begomovirus* existentes, medidas de controle devem ser adotadas em conjunto na tentativa de reduzir a população do inseto vetor, bem como o inóculo de vírus no campo. O controle químico do vetor tem onerado os custos de produção. Neste cenário, a busca de cultivares resistentes aos begomovírus e/ou ao inseto vetor constitui um importante objetivo dos programas de melhoramento e importante estratégia, no caso de resistência ao vetor, para uso em programas de manejo integrado de pragas (Meagher Junior *et al.*, 1997).

Acessos de tomateiro cultivado e de espécies selvagens já foram identificados apresentando resistência a isolados de begomovírus brasileiros (Ferreira *et al.*, 1999; Santana *et al.*, 2001 e Giordano *et al.*, 2005b). Foram também identificados acessos combinando resistência simultânea a begomovírus e ao inseto-vetor (Villas Bôas *et al.*, 2002), bem como resistência exclusiva ao vetor (Channarayappa *et al.*, 1992; Barten *et al.*, 1994 e Heinz & Zalom, 1995). De modo geral, a resistência de plantas a insetos pode ser devida a mecanismos de antibiose, antixenose e tolerância (Painter, 1951). Em espécies de *Solanum* (seção *Lycopersicon*), tricomas glandulares presentes em folhas e ramos, além de oferecerem resistência mecânica (Dimock & Kennedy, 1983), são responsáveis pela secreção de metabólitos, denominados aleloquímicos. Estes aleloquímicos, secretados por diferentes tipos de tricomas glandulares, podem resultar em efeito metabólico tóxico (antibiose) ou deterrente (não preferência ou antixenose). Dentre estes, destacam-se o 2-tridecanona presente em *S. habrochaites* var. *glabratum*, secretado por tricomas tipo VI, o zingibereno (sesquiterpenos) presente em *S. habrochaites* var. *habrochaites*, secretado por tricomas tipo IV e acilaçúcares presentes em *S. pennellii*, secretados por tricomas tipo IV (Burke *et al.*, 1987; Juvik *et al.*, 1988 e Aragão *et al.*, 2000). Acilaçúcares, encontrados em *S. pennellii*, têm sido considerados como fatores de resistência à mosca-banca (Azevedo *et al.*, 1999; Pamplona, 2001 e Rezende, 2003), entretanto, existe uma grande variação entre os acessos quanto ao nível de acilaçúcares produzidos, além da influência de estresses ambientais e fatores meteorológicos (Shapiro *et al.*, 1994). Em estudos de preferência entre

genótipos de tomateiro quanto à oviposição de *B. tabaci* biótipo B, Fancelli *et al.* (2003) constataram que *S. pennellii* ‘LA 716’ comportou-se como um dos menos atrativos ao inseto, seguido por acessos de *S. habrochaites* e *S. habrochaites* f. *glabratum*. No entanto são escassas as informações sobre a influência da interação planta-inseto nas respostas diferenciadas a begomovírus observadas em acessos resistentes à *B. tabaci* biótipo B. No presente trabalho, acessos pertencendo a cinco espécies de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) com diferentes níveis de resistência à mosca-branca foram avaliados quanto à resposta à infecção por begomovírus, tendo como objetivo estimar os potenciais efeitos da resistência ao inseto-vetor na transmissão/incidência desta virose.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Avaliação para resistência à mosca-branca:** Um ensaio foi conduzido na Embrapa Hortaliças para estimar os níveis de resistência à mosca-branca nos seguintes acessos de *Solanum* (seção *Lycopersicon*): ‘CNPH 409’ (*S. pennellii* ‘LA 716’); ‘CNPH 410’ (*S. chilense* ‘LA 1967’); ‘CNPH 416’ (*S. habrochaites* ‘PI 126445’); ‘CNPH 421’ (*S. habrochaites* f. *typicum* ‘PI 127827’); ‘CNPH 423’ (*S. habrochaites* f. *glabratum* ‘PI 134417’); ‘CNPH 424’ (*S. habrochaites* f. *glabratum* ‘PI 134418’) e ‘TX-468-RG’ (*S. lycopersicum*). A cultivar ‘Viradoro’ suscetível aos begomovírus e à mosca-branca, foi utilizada como controle. Vasos de 5 L com quatro plantas com 30 dias pós-semeio foram dispostos em um delineamento inteiramente ao acaso, dentro de um telado, contendo populações de *B. tabaci* biótipo B avirulíferas. Após a exposição, por 15 dias das plantas aos insetos, foram feitas duas avaliações, aos quatro e aos 21 dias. Aos quatro dias foram feitas avaliações visuais da infestação de ovos nas folhas, atribuindo notas (1= sem infestação a 4 = infestação elevada). Em laboratório, com o auxílio de lupa, foi contado o número médio de ovos (em uma área foliar de 1,4 cm<sup>2</sup> por folíolo) em amostras obtidas de três folíolos por região da planta (apical, mediana e basal). Na segunda avaliação, aos 21 dias, também foram atribuídas notas (1= sem infestação a 4 = elevada), de acordo com a presença de pupas (ninfas no final do quarto ínstar) observadas visualmente nas folhas; em laboratório, foram feitas contagens de pupas com o auxílio de lupa.

### **Avaliação dos acessos quanto ao nível de resistência à infecção por begomovírus via inoculação com moscas-brancas virulíferas**

No primeiro ensaio, os mesmos acessos acima citados e avaliados quanto à colonização por *Bemisia tabaci* ('CNPH 409', 'CNPH 410', 'CNPH 416', 'CNPH 421'; 'CNPH 423'; 'CNPH 424'; 'Viradoro' e 'TX-468-RG'), foram dispostos em um desenho experimental de blocos casualizados com cinco repetições, sendo avaliadas, dependendo do acesso, de 4 a 16 plantas por repetição. As plantas foram inoculadas com 15 dias após semeio, sendo expostas durante 14 dias a uma alta pressão populacional de moscas-brancas virulíferas. Em seguida, as plantas foram pulverizadas com inseticida e removidas para uma casa-de-vegetação livre do inseto vetor. A severidade da doença foi avaliada usando uma escala de 1 = sem sintomas; 2 = amarelecimento e mosaico dos folíolos 3 = mosaico, enrugamento dos folíolos, clorose internerval e epinastia e 4 = mosaico, enrugamento severo e nanismo. Folhas apicais de um subgrupo de plantas avaliadas para sintomas visuais foram amostradas ao acaso dentro de cada repetição visando determinar a frequência de plantas apresentando infecção sistêmica pelo begomovírus usando a técnica de 'Polymerase chain reaction' PCR. Foram coletadas amostras foliares dentro das parcelas, e o DNA total foi extraído individualmente de cada planta, usando o método de CTAB modificado (Boiteux *et al.*, 1999). Um segmento do componente A do DNA viral foi seletivamente amplificado via PCR, utilizando 'primers' universais ('PALv715' e 'PARc1978') desenvolvidos para detecção de diferentes espécies de *Begomovirus* (Rojas *et al.*, 1993). Os produtos obtidos com a PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose (1,0%).

Em um segundo ensaio avaliou-se os acessos 'CNPH 409', 'CNPH 410', 'CNPH 416', 'CNPH 421'; 'CNPH 423'; *S. pimpinellifolium* 'CNPH 1678' (= 'TO-937') e 'Viradoro' mediante exposição a uma alta população de moscas-brancas virulíferas durante todo o tempo em que o ensaio foi conduzido. A severidade da doença foi avaliada 45 dias após semeio usando a mesma escala de notas. Neste segundo ensaio, amostras foliares de plantas colonizadas naturalmente por *B. tabaci* foram coletadas a partir da segunda ou terceira folha verdadeira do ápice da planta. As amostras foram imobilizadas diretamente (duas repetições por planta) em membrana de náilon N+ (Nylon<sup>+</sup>, Roche Diagnostics). A sonda usada (componente A) foi marcada com digoxigenina (DIG-dUTP, Roche Diagnostics) e revelada por quimioluminescência (anti-DIG-AP, Roche Diagnostics; ECL detection kit,

GE). Os controles negativo e positivo foram plantas de tomate sadio e plantas da cultivar ‘Viradoro’ infectadas, respectivamente. Pré-hibridização e hibridização foram realizadas a 68° C.

**Confirmação dos isolados virais usados como inóculo:** Alíquotas dos produtos da PCR obtidos de amostras sintomáticas de uma amostra dos acessos avaliados nos dois ensaios foram diretamente sequenciadas usando o kit Big-Dye III em um sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), do Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças. A análise da sequência foi feita empregando-se o algoritmo BlastN ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivares resistentes à mosca-branca têm sido relatadas para culturas como abóbora (*Cucurbita* spp.) (Alves *et al.*, 2005), algodão (*Gossypium hirsutum*) (Toscano *et al.*, 2003), soja (*Glycine Max*) (Valle & Lourenção, 2002 e Lima & Lara, 2004) e tomate (Toscano *et al.*, 2002b). Em estudos de preferência entre acessos de tomateiro para oviposição de *B. tabaci* biótipo B, Fancelli *et al.* (2003) constataram que *S. pennellii* ‘LA 716’ e, em menor proporção *S. habrochaites* e *S. habrochaites* f. *glabratum* foram resistentes a este inseto. Por sua vez, acessos de *S. lycopersicum* (exceto ‘Santa Clara’) têm sido citados como suscetíveis a *B. tabaci* (Heinz & Zalon, 1995). Quanto aos begomovírus, vários níveis de resistência aos monopartidos e bipartidos têm sido encontradas em espécies selvagens de *Solanum*, podendo ser citadas *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. peruvianum* e *S. chilense* (Picó *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 1999; Picó *et al.*, 1999; Pilowsky & Cohen, 2000 e Santana *et al.*, 2001).

Para o primeiro ensaio de inoculação com begomovírus, mediante *B. tabaci*, a análise da sequência de nucleotídeos indicou que o inóculo empregado foi correspondente à espécie Tomato mottle leaf curl virus. Esta é uma das espécies do complexo de *Begomovirus* de genoma bipartido descritos infectando tomate no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2003 e Inoue-Nagata *et al.*, 2006) e tem sido utilizada nos trabalhos de seleção de plantas resistentes.

As reações dos acessos de *Solanum* avaliados frente à população de mosca-branca avirulífera (*Bemisia tabaci* biótipo B) considerando a presença e número de ovos e pupas

nas folhas estão apresentadas na Tabela 1. Neste conjunto de experimentos, o acesso *S. pennellii* ‘LA 716’ apresentou os níveis mais elevados de resistência à mosca-branca com base em todos os critérios avaliados (Tabela 1), confirmando dados previamente obtidos no Brasil (Fancelli & Vendramim, 2002; Toscano *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2002a; Fancelli *et al.*, 2003 e Baldin *et al.*, 2005). Este acesso apresentou ainda reduzida expressão de sintomas de begomovírus, com valor médio igual a 1,21 (Tabela 2) e 1,04 (Tabela 3). Em condições de inoculação contínua via *B. tabaci*, somente três plantas foram classificadas com valor médio de 1,5 em um total de 60, entretanto cinco de 20 plantas analisadas por hibridização molecular mostraram acumulação viral.

*Solanum pennellii* ‘LA 716’ tem se mostrado resistente a vários insetos, com destaque à *B. tabaci*, devido à presença do aleloquímico acilaçúcar, que confere um aspecto pegajoso na superfície foliar que funciona como armadilha natural (Gilardón *et al.*, 2001). No experimento de infecção pelo vetor, aproximadamente 14,2% das plantas de *S. pennellii* ‘LA 716’ exibiram sintomas de infecção. É interessante notar que ‘LA 716’ foi considerado ‘tolerante’ a um isolado egípcio do *Tomato yellow leaf curl virus* (Hassan & Abdel-Ati, 1999), provavelmente devido aos escapes e/ou infecção tardia que proporciona à resistência deste acesso ao vetor. De fato, trabalhos têm demonstrado que quanto mais tardia a infecção, menores as perdas observadas devido à infecção por begomovírus (Giordano *et al.*, 2005a).

Dentre os mecanismos de resistência, a antixenose é a mais citada para o tomateiro. A resistência de diferentes acessos de *Solanum* a insetos tem sido atribuída à presença de tricomas glandulares (tipos I, IV, VI, VII) e não-glandulares (tipos II, III e V) (Luckwill, 1943). A presença dos tricomas tipo IV e VI encontrados nas espécies *S. habrochaites*, *S. habrochaites* f. *glabratum* e *S. pennellii* tem sido relatada como os fatores que condicionam resistência a *B. tabaci* (Channarayappa *et al.*, 1992; Barten *et al.*, 1994 e Snyder *et al.*, 1998).

Os tricomas tipos IV e VI de alguns acessos de *S. habrochaites*, por exemplo, produzem zingibereno que confere resistência a ácaros (Guo *et al.*, 1993), à *B. tabaci* (Freitas *et al.*, 2002a) e à traça (*Tuta absoluta*) (Azevedo *et al.*, 2003). Tricomas do tipo VI de *S. habrochaites* f. *glabratum* produzem 2-undecanona e 2-tri-decanona, que apresentam efeitos de antixenose e antibiose sobre ácaros (Guo *et al.*, 1993), *B. tabaci* (Channarayappa *et al.*, 1992 e Snyder *et al.*, 1998) e *T. absoluta* (Maluf *et al.*, 1997).



Os principais efeitos da 2-tri-decanona em artrópodes incluem o aumento da mortalidade, período de desenvolvimento mais prolongado, oviposição reduzida e estímulo alimentar reduzido (Mugai *et al.*, 2002). De fato, existem estudos sugerindo uma estreita associação entre os teores de 2-tri-decanona e resistência à mosca-branca (Freitas *et al.*, 2002a). Estudos adicionais têm minimizado a ação de repelência e toxicidade do composto 2-tri-decanona e indicado a influência de compostos do tipo hidrocarbonetos sesquiterpenos (por exemplo, 'ginger oil' e zingibereno) (Mugai *et al.*, 2002 e Freitas *et al.*, 2002b) e do composto 2-undecanona (Mugai *et al.*, 2002). Neste contexto, seria interessante avaliar, em experimentos futuros, a correlação entre os teores destes compostos secundários com a frequência de plantas escapes não apresentando sintomas e/ou acumulação de vírus.

Em *S. pennellii*, tricomas tipo IV são responsáveis pela produção de acilaçúcares (Burke *et al.*, 1987). Estes fitoquímicos apresentam efeito deterrente sobre *Liriomyza trifolii* (Hawthorne *et al.*, 1992), *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa zea* (Juvik *et al.*, 1994) e *B. tabaci* (Liedl *et al.*, 1995). O limite mínimo da concentração efetiva de acilaçúcar contra a mosca-branca foi calculado em 38 mg/cm<sup>2</sup> de área foliar (Nombela *et al.*, 2000). Estes acilaçúcares inibem o inseto nos processos de oviposição e estímulo à alimentação, dificultando e/ou retardando a oviposição, alimentação e reduzindo a eficiência da transmissão de begomovírus (Rodriguez *et al.*, 1992; Liedl *et al.*, 1995; Fancelli & Vendramim, 2002; Freitas *et al.*, 2002b; Fancelli *et al.*, 2003 e Mugai *et al.*, 2003). No presente experimento, algumas plantas de *S. pennellii* 'LA 716' mostraram suscetibilidade ao vírus (notas variando entre 2,0 e 3,0) (Tabela 2). No entanto, observou-se neste acesso predominância de plantas sem sintomas (85,7%), indicando que fatores de resistência ao inseto possam estar, de fato, interferindo na habilidade do vetor em transmitir o vírus.

Resultados obtidos no presente estudo indicaram que os acessos de *S. habrochaites* 'PI-134417', 'PI-134418', 'PI-126445' e 'PI-127827' permitiram a oviposição do inseto, entretanto, foram observadas diferenças estatísticas entre estes (Tabela 1). Fancelli *et al.* (2005) observaram resistência por antixenose em alguns acessos de *S. habrochaites*, como 'LA-1739' e 'PI-134417'. Ainda com relação aos acessos de *S. habrochaites*, observaram-se níveis diferenciados de suscetibilidade ao Tomato mottle leaf curl virus, variando entre 3,8% e 71% de plantas com sintomas de infecção viral (Tabela 2). Nos dois ensaios realizados, o destaque foi o acesso 'CNPH 421' (*S. habrochaites* f. *typicum* 'PI 127827')

que, embora suscetível à infestação por mosca-branca, apresentou sintomas suaves à infecção por begomovírus (notas = 1,24 e 1,10) (Tabelas 2 e 3). Estes resultados com o ‘PI 127827’ sugerem tratar-se de uma resistência exclusiva ao vírus.

A reação dos acessos a infecção pelo Tomato mottle leaf curl virus está apresentada na Tabela 2. Diferenças significativas foram observadas entre os acessos para o critério frequência de plantas com infecção sistêmica por begomovírus. A cultivar ‘Viradoro’ (suscetível ao begomovírus e à mosca-branca) foi utilizada como controle. ‘Viradoro’ e ‘TX-468-RG’ (*S. lycopersicum*) apresentaram 100% e 83,3%, de plantas com detecção positiva por PCR para begomovírus respectivamente. O acesso de melhor performance foi *S. chilense* ‘LA 1967’, que apresentou todas as plantas livres de infecção sistêmica nos dois ensaios (Tabelas 2 e 3 e Figura 1), sendo este acesso submetido a condições de exposição contínua a moscas-brancas virulíferas. *Solanum chilense* ‘LA 1967’ apresentou somente duas plantas (do total de 57) com sintomas correspondentes a 1,5, e não acumulando vírus em nenhuma das 20 plantas analisadas (Tabela 3). Fontes de resistência a espécies de *Begomovirus* provenientes de *S. chilense* têm sido amplamente utilizadas em programas de melhoramento, como por exemplo, o gene *Ty-1*, proveniente de ‘LA 1969’ derivada de *S. chilense*, cuja expressão fenotípica de tolerância é aumentada em linhas homozigotas para o gene (Zamir *et al.*, 1994).

Os acessos de *S. habrochaites* ‘PI 134417’, ‘PI 134418’ e ‘PI 126445’ apresentaram médias de sintomas inferiores a 2,0 nos dois ensaios independentes, entretanto acumularam vírus em ambos os casos. Mediante alta pressão de inóculo (exposição contínua ao inseto vetor virulífero) o acesso ‘PI-134417’ apresentou 17 plantas positivas no total de 20, enquanto ‘PI-126445’ apresentou 71% e 58% de plantas infectadas (Tabelas 2 e 3 e Figura 1). Resultados para o acesso ‘PI-134418’ indicaram 44% de plantas infectadas, porém na avaliação de sintomas foram observadas algumas plantas altamente suscetíveis com notas 3 e 4 (Tabela 2). O controle suscetível ‘Viradoro’ também se mostrou extremamente suscetível à colonização por mosca-branca, além de expressão severa de sintomas de begomovírus (nota = 4). A linhagem ‘TX-468-RG’ comportou-se como suscetível à mosca-branca e exibiu sintomas suaves da infecção (nota = 1,7), porém, com elevada frequência (83,3%) de plantas positivas na detecção por PCR, indicando infecção sistêmica pelo vírus. Desta forma, estes resultados indicam que o acesso ‘TX-468-RG’ apresenta resposta do tipo

‘tolerância’ (*sensu* Cooper & Jones, 1983) a doença, indicando que a tolerância não está relacionada com a resistência à transmissão do vírus pela mosca-branca (Tabela 2).

Fontes de resistência a insetos provenientes de *S. pimpinellifolium* vem sendo relatadas. Fancelli *et al.* (2005) relataram que o acesso ‘LA-1584’ destacou-se por reduzir a sobrevivência de *B. tabaci*, prolongar o seu ciclo e propiciar oviposição intermediária. Outro acesso avaliado quanto à infecção por begomovírus, apenas no segundo experimento, foi *S. pimpinellifolium* ‘CNPH 1678’ (=‘TO-937’). Este acesso apresentou média de sintomas 2,0. No entanto, foram observadas também plantas suscetíveis com notas mais altas e os dados de hibridização indicaram que 70% das plantas avaliadas acumularam vírus (Tabela 3 e Figura 1). Estes resultados parecem confirmar a resistência ao vetor, uma vez que foram observadas algumas plantas com notas 3. A resistência ao vetor de *S. pimpinellifolium* ‘CNPH 1678’ (=‘TO-937’) não pôde ser confirmada no presente ensaio devido ao número reduzido de sementes disponíveis. No entanto este acesso já foi anteriormente identificado como resistente a *B. tabaci* e esta resistência ao vetor contribui para a redução da dispersão primária de *Tomato yellow leaf curl virus* (Rodriguez *et al.*, 2008). O acesso ‘TO-937’ também foi descrito como fonte de resistência ao ácaro *Tetranychus urticae* em ensaios controlados (Fernández-Muñoz, 2000 e 2003). O interessante é que os altos teores de acilaçúcares (tricomatos tipo IV), semelhante aos acessos de *S. pennellii*, foram diretamente correlacionados com alta mortalidade, repelência e oviposição de *T. urticae* (Alba *et al.*, 2009) e mosca-branca (Rodriguez-López *et al.*, 2008). É importante mencionar, que a grande vantagem do uso da resistência derivada de *S. pimpinellifolium* sobre outras fontes de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) é o fato desta espécie ser compatível em cruzamentos com *S. lycopersicum*.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que um tipo diferenciado de resposta à mosca-branca pode estar operando no acesso *S. chilense* ‘LA 1967’ (‘CNPH 410’). Este acesso apresenta valores intermediários para o número de pupas, sugerindo que os elevados níveis de resistência aos begomovírus possam ser parcialmente atribuídos a fatores pré-infeccionais. *Solanum chilense* ‘LA 1967’ foi o único acesso com 100% de plantas livres de infecção sistêmica por begomovírus, mesmo em plantas amostradas e que inicialmente, exibiram sintomas suaves (nota =2), resultantes de presumível infecção viral. As informações disponíveis sobre os mecanismos associados com níveis de resistência à

mosca-branca em espécies de *Solanum* do chamado complexo 'peruvianum' (*S. peruvianum* e *S. chilense*) ainda encontram-se dispersas, necessitando de melhor caracterização experimental. Existe a confirmação de que os genes *Mi* e *Rme-1* (que juntos controlam resistência a espécies de *Meloidogyne* e afídeos) derivados de *S. peruvianum* também condicionam níveis de antixenose e antibiose a populações de mosca-branca (Martinez-de-Illarduya *et al.*, 2004). Em nosso estudo, o acesso de *S. chilense* apresentou a menor nota para a presença de pupas, em comparação com todos os acessos de *S. lycopersicum* e *S. habrochaites* avaliados. No entanto, os níveis de oviposição não foram aparentemente afetados (Tabela 2). Este tipo de componente de resistência com impacto em uma etapa específica do ciclo de vida de *B. tabaci* biótipo B (redução na população de pupas) pode ser interessante dentro de programas de melhoramento, objetivando a incorporação desta característica em linhagens elite de tomate.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados indicam que o desenvolvimento de genótipos resistentes ao inseto-vetor poderá apresentar impactos significativos na redução da incidência e severidade da infecção por begomovírus. A resistência ao vetor pode ser empregada como estratégia adicional e complementar de manejo do complexo de begomovírus que têm sido registrados infectando tomateiro no Brasil. A base genética da resistência à *B. tabaci* biótipo B pode ainda ser expandida, uma vez que mecanismos aparentemente distintos encontram-se presentes em *S. chilense*, *S. habrochaites* e *S. pennellii*.

**Tabela 1** - Reação de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) quanto à colonização por uma população de mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) avirulífera.

| Espécie de <i>Solanum</i> (Seção <i>Lycopersicon</i> ) | Acessos                  | Presença* |        | Contagem* |         |
|--|--------------------------|-----------|--------|-----------|---------|
|  |                          | Ovos      | Pupas  | Ovos      | Pupas   |
| <i>S. chilense</i>                                     | ‘CNPB 410’ (‘LA 1967’)   | 3,0 B     | 2,0 B  | 75,9 BC   | 10,6 B  |
| <i>S. habrochaites</i>                                 | ‘CNPB 416’ (‘PI 126445’) | 3,6 BC    | 3,0 C  | 91,3 C    | 10,3 B  |
| <i>S. habrochaites</i> f. <i>typicum</i>               | ‘CNPB 421’ (‘PI 127827’) | 3,2 BC*   | 3,2 CD | 69,7 BC   | 10,7 B  |
| <i>S. habrochaites</i> f. <i>glabratum</i>             | ‘CNPB 423’ (‘PI 134417’) | 3,0 B     | 3,6 DE | 32,6 B    | 15,2 BC |
| <i>S. habrochaites</i> f. <i>glabratum</i>             | ‘CNPB 424’ (‘PI 134418’) | 3,2 BC    | 3,0 C  | 54,7 BC   | 17,5 C  |
| <i>S. pennellii</i>                                    | ‘CNPB 409’ (‘LA 716’)    | 1,8 A     | 1,0 A  | 0,4 A     | 0,10 A  |
| <i>S. lycopersicum</i>                                 | ‘Viradoro’               | 3,8 C     | 4,0 E  | 69,0 BC   | 14,6 BC |
| <i>S. lycopersicum</i>                                 | ‘TX-468-RG’              | 3,2 BC    | 4,0 E  | 38,5 BC   | 15,0 BC |

\*Valores seguidos pela mesma letra dentro de cada coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan (5%).

**Tabela 2** - Avaliação de resistência de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) à infecção por Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV).

| Espécie de <i>Solanum</i> (Seção <i>Lycopersicon</i> ) | Acessos                  | NPA <sup>1</sup> | Classes de sintomas <sup>*,3</sup> |    |    |    | Média sintomas | PCR positiva |
|--|--------------------------|------------------|------------------------------------|----|----|----|----------------|--------------|
|  |                          |                  | 1                                  | 2  | 3  | 4  |                |              |
| <i>S. chilense</i>                                     | ‘CNPB 410’ (‘LA 1967’)   | 22               | 15                                 | 07 | 00 | 00 | 1,32 bc**      | 00/18        |
| <i>S. habrochaites</i>                                 | ‘CNPB 416’ (‘PI 126445’) | 21               | 06                                 | 15 | 00 | 00 | 1,71 b         | 12/17        |
| <i>S. habrochaites</i> f. <i>typicum</i>               | ‘CNPB 421’ (‘PI 127827’) | 67               | 51                                 | 16 | 00 | 00 | 1,24 c         | 01/26        |
| <i>S. habrochaites</i> f. <i>glabratum</i>             | ‘CNPB 423’ (‘PI 134417’) | 62               | 53                                 | 05 | 04 | 00 | 1,21 c         | 03/24        |
| <i>S. habrochaites</i> f. <i>glabratum</i>             | ‘CNPB 424’ (‘PI 134418’) | 62               | 48                                 | 07 | 04 | 03 | 1,39 bc        | 11/25        |
| <i>S. pennellii</i>                                    | ‘CNPB 409’ (‘LA 716’)    | 28               | 24                                 | 02 | 02 | 00 | 1,21 c         | 02/14        |
| <i>S. lycopersicum</i>                                 | ‘Viradoro’               | 79               | 00                                 | 00 | 00 | 79 | 4,00 a         | 05/05        |
| <i>S. lycopersicum</i>                                 | ‘TX-468-RG’              | 57               | 16                                 | 41 | 00 | 00 | 1,72 b         | 20/24        |

\*Escala de severidade da doença baseada em avaliações visuais onde 1= sem sintomas; 2= amarelhecimento e mosaico dos folíolos; 3= mosaico, enrugamento dos folíolos, clorose internerval e epinastia e 4 = mosaico, enrugamento severo e nanismo.

\*\* Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan (5% probabilidade).

<sup>1</sup>NPA = Número de plantas avaliadas.

**Tabela 3** - Avaliação de resistência de *Solanum* spp. (seção *Lycopersicon*) à infecção por um isolado de begomovírus bipartido via moscas-brancas virulíferas.

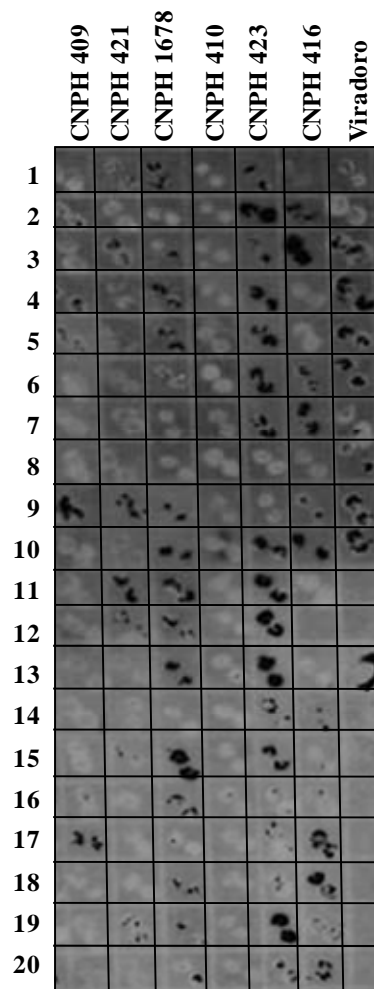
| Espécie de <i>Solanum</i> (Seção <i>Lycopersicon</i> ) | Acessos                  | NPA | Média sintomas | Amplitude variação sintomas <sup>a</sup> | Hibridização positivas/total |
|--|--------------------------|-----|----------------|--|------------------------------|
| <i>S. pennellii</i>                                    | ‘CNPB 409’ (‘LA 716’)    | 60  | 1,04           | 1,0-1,5*                                 | 05/20                        |
| <i>S. chilense</i>                                     | ‘CNPB 410’ (‘LA 1967’)   | 57  | 1,04           | 1,0-1,5**                                | 00/20                        |
| <i>S. habrochaites</i>                                 | ‘CNPB 416’ (‘PI 126445’) | 57  | 1,16           | 1,0-2,5                                  | 11/19                        |
| <i>S. habrochaites</i> f. <i>typicum</i>               | ‘CNPB 421’ (‘PI 127827’) | 53  | 1,05           | 1,0-2,0                                  | 07/20                        |
| <i>S. habrochaites</i> f. <i>glabratum</i>             | ‘CNPB 423’ (‘PI 134417’) | 53  | 1,81           | 1,0-3,5                                  | 17/20                        |
| <i>S. pimpinellifolium</i>                             | ‘CNPB 1678’ (TO – 937)   | 60  | 2,04           | 1,0-3,0                                  | 14/20                        |
| <i>S. lycopersicum</i>                                 | ‘Viradoro’               | 58  | 3,88           | 3,5-4,0                                  | 10/10                        |

a = \*Escala de severidade da doença onde 1= sem sintomas; 2= amarelecimento e mosaico dos folíolos 3= mosaico, enrugamento dos folíolos, clorose internerval e epinastia e 4 = mosaico, enrugamento severo e nanismo.

\* Três plantas com nota 1,5.

\*\* Duas plantas com 1,5.

NPA = Número de plantas avaliadas.



**Figura 1** - Detecção de begomovírus em amostras foliares dos acessos ‘CNPH 409’, ‘CNPH 421’, ‘CNPH 1678’, ‘CNPH 410’, ‘CNPH 423’, ‘CNPH 416’ e do controle suscetível ‘Viradoro’. Amostras foram coletadas aos 45 dias após semeio em plantas expostas à inoculação contínua de uma espécie de begomovírus bipartido por *Bemisia tabaci*. As amostras foram imobilizadas diretamente (duas repetições por planta) em membrana de náilon N+ (Nylon<sup>+</sup>, Roche Diagnostics). Foi utilizada uma sonda para o DNA-A, marcada com digoxigenina e revelada por quimioluminescência. Os controles usados como negativo e positivo foram plantas de tomate sadio e plantas da cultivar ‘Viradoro’ infectadas. Os números à esquerda indicam o código da amostra planta dentro de cada acesso.

## CAPÍTULO 5

### **Mecanismos associados com a resistência derivada de ‘TX-468-RG’ derivada de ‘Tyking’ ao *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) e seus efeitos na dispersão primária e secundária do vírus via *Bemisia tabaci* biótipo Q**

Rita de Cássia Pereira-Carvalho<sup>1,2,3</sup>, Leonardo S. Boiteux<sup>1,2</sup>, Maria Esther de Noronha Fonseca<sup>1</sup>,  
Enrique Moriones<sup>3</sup>, Rafael Fernandez-Muñoz<sup>3</sup>, Juan M. Días-Pendon<sup>3</sup> e Renato O. Resende<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-<sup>2</sup>Universidade de  
Brasília (UnB) - Departamentos de Fitopatologia e Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900,  
Brasília-DF, Brazil

<sup>3</sup>Estação Experimental ‘La Mayora’, CSIC, 29760 Algarrobo-Costa (Málaga), Espanha.



## RESUMO

A enfermidade ‘Tomato yellow leaf curl disease’ (TYLCD) é uma das principais limitações ao cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) em diversas regiões do mundo. Esta doença é causada por espécies distintas de *Begomovirus* transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. A linhagem de tomate ‘TX-468-RG’, derivada do híbrido ‘Tyking’, é uma fonte monogênica recessiva que foi identificada conferindo resistência a diferentes espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido e a um conjunto de espécies do ‘complexo viral TYLCD’. Os objetivos do presente trabalho foram estudar os mecanismos de resistência que operam em ‘TX-468-RG’ e os efeitos desta resistência em aspectos epidemiológicos associados com dispersão de *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL). Ensaio de agroinoculação com TYLCV-IL indicaram acumulação viral de quatro a oito vezes menor em ‘TX-468-RG’ quando comparada com ‘MoneyMaker’ (cultivar suscetível). Ensaio com diferentes combinações enxerto e porta-enxerto indicaram que a resistência de ‘TX-468-RG’ interfere na translocação de TYLCV-IL a longas distâncias dentro da planta infectada. Foi observada uma redução na acumulação viral nas folhas apicais de ‘TX-468-RG’ em todas as épocas analisadas, mesmo em condições de fluxo contínuo de vírus (i.e. enxerto sobre plantas infectadas). Desta forma, as principais manifestações fenotípicas da resistência da linhagem ‘TX-468-RG’ ao TYLCV-IL são, limitação da acumulação e translocação sistêmica do vírus e expressão atenuada de sintomas sob alta pressão de inóculo viral. Em ensaios de dispersão primária de TYLCV-IL, após a introdução de moscas-brancas virulíferas, 41% das plantas de ‘TX-468-RG’ e 91% de plantas de ‘MoneyMaker’ estavam infectadas aos 28 dias após o tratamento para mosca-branca. Nos ensaios de livre escolha, a percentagem de plantas infectadas em ‘TX-468-RG’ também foi significativamente menor. ‘TX-468-RG’ também foi avaliada como fonte secundária de dispersão de inóculo de TYLCV-IL de plantas infectadas para plantas sadias. Os resultados destes ensaios indicaram restrição nos níveis de infecção tanto em plantas de ‘MoneyMaker’ como em ‘TX-468-RG’. Desta forma, a baixa acumulação viral em plantas resistentes da linhagem ‘TX-468-RG’ propicia redução da dispersão primária e secundária de TYLCV. Neste contexto, a incorporação e uso desta fonte de resistência poderão ter impactos epidemiológicos positivos no manejo das espécies

virais pertencentes ao ‘complexo viral TYLCD’, podendo limitar a dispersão dos vírus em condições de campo.

**Palavras-chave:** *Begomovirus*, epidemiologia, resistência, *Bemisia tabaci* biótipo Q, *Solanum*

## ABSTRACT

Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) is one of the major economic constraints of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in many regions of the world. This disease is caused by a complex of distinct *Begomovirus* species, which are transmitted by whiteflies (*Bemisia tabaci*). The tomato inbred line ‘TX-468-RG’ (derived from the hybrid ‘Tyking’), is a monogenic recessive source of resistance to *Begomovirus* species with bipartite and monopartite genomes (TYLCD complex). The main objective of this work was to investigate the resistance mechanisms present in the inbred line ‘TX-468-RG’ as well as its effects on epidemiological aspects associated to *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) dispersion. Agroinoculation assays using an isolate of TYLCV-IL, indicated that viral accumulation is 4 to 8-fold less in the line ‘TX-468-RG’ when compared with ‘Moneymaker’ (susceptible cultivar). Experiments carried out with different combinations of scion-rootstock indicated that the resistance of ‘TX-468-RG’ interferes with TYLCV-IL translocation at long distances within the infected plant. It was observed in time course experiments a decrease in the viral accumulation in the apical leaves of ‘TX-468-RG’ even with continuous virus load (i.e. healthy scions grafted onto infected rootstocks). Therefore, the main phenotypic expression of resistance of ‘TX-468-RG’ to TYLCV-IL was the reduced viral accumulation and translocation in the tissue and the presence of mild symptoms under heavy inoculum pressure. Experiments aimed to study primary dispersion of TYLCV-IL after introduction of viruliferous whiteflies, indicated 41% ‘TX-468-RG’ and 91% ‘Moneymaker’ plants showing systemic infection. In free-choice assays, the frequency of infected ‘TX-468-RG’ plants was significantly lower than that of ‘Moneymaker’. The inbred line ‘TX-468-RG’ was also investigated as source of secondary dispersion of TYLCV-IL (i.e. serving as inoculum for healthy plants). The results indicated a reduced level of infection in both ‘Moneymaker’ and ‘TX-468-RG’ plants. Therefore, even when

infected ‘TX-468-RG’ plants are the sources of TYLCV-IL inoculum, the levels of resistance of this inbred line impart a less intense level of both primary and secondary dispersion of TYLCV-IL. In this context, the incorporation and employment of this resistance into commercial cultivars might have positive epidemiological impacts in the management of TYLCD, which could result in limited levels of virus dispersion under natural field conditions.

**Keywords:** *Begomovirus*, epidemiology, resistance, *Bemisia tabaci* biotype Q.

## INTRODUÇÃO

Espécies de *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são consideradas os principais vírus de tomateiro no mundo (Brown *et al.*, 1995 e Seal *et al.*, 2006), já tendo sido relatadas mais de 60 espécies capazes de infectar o tomateiro (Jones, 2003 e Marín, 2004). A maioria das espécies do gênero *Begomovirus* descrita no Novo Mundo apresenta dois componentes genômicos compostos por DNA circular de fita simples denominados DNA-A e DNA-B. Atualmente, nove espécies virais estão confirmadas (Fauquet *et al.*, 2008), outras duas reconhecidas recentemente e mais cinco espécies estão provisoriamente classificadas dentro do ‘complexo viral’ conhecido como TYLCD (Fauquet *et al.*, 2008 ). A maioria das espécies deste complexo possuem genoma monopartido, com exceção do *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* e *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (Rochester *et al.*, 1994 e Green *et al.*, 2002), que possuem genoma bipartido. O DNA-A das espécies de genoma monopartido possui todos os genes codificadores das proteínas necessárias para infecção e movimento dentro do tecido da planta hospedeira. As espécies do ‘complexo TYLCD’ apresentam a característica de se manterem restritas ao tecido do floema e são transmitidas naturalmente por mosca-branca *Bemisia tabaci* Genn. (família *Aleyrodidae*).

Uma das principais espécies do ‘complexo viral TYLCD’ é o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) descrito em Israel em 1939 (Marín, 2004). Este vírus foi posteriormente denominado TYLCV-IL (*Tomato yellow leaf curl virus-Israel*). TYLCV-IL é um exemplo marcante da rápida disseminação de espécies de *Begomovirus* cujo padrão de dispersão inicial foi a região mediterrânea da Europa e norte da África, seguido pela dispersão para outros continentes. Atualmente, as espécies do ‘complexo TYLCD’ estão registradas nas

Américas, Europa, África e Ásia (Marín, 2004). A presença de begomovírus em cultivos de tomate na Espanha foi relatada pela primeira vez em 1992, associada à expansão de *B. tabaci* em cultivos sob condições de telado nas províncias de Múrcia e Almeria (Moriones *et al.*, 1993). Naquela época foi constatada a presença de uma nova espécie denominada *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV). Nos anos subsequentes, epidemias associadas a diferentes espécies pertencentes ao ‘complexo viral TYLCD’ foram reportadas causando perdas severas nos cultivos de tomate em todo o Sul e Sudeste da Península Ibérica, Ilhas Baleares e Canárias (Monci *et al.*, 2000 e Font *et al.*, 2002 a, b).

Essa capacidade de dispersão e a variabilidade genética de espécies de *Begomovirus* nas principais regiões produtoras de tomate no mundo parecem estar diretamente associadas com a capacidade de transmissão das espécies virais pela mosca-branca. A mosca-branca vetora dos begomovírus encontra-se amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada uma das pragas mais destrutivas para a agricultura mundial (Harrison, 1985; Perring *et al.* 1993; Brown, 1994 e Polston & Anderson 1999). *Bemisia tabaci* possui vários biótipos e variações em biótipos têm sido descritas associadas à amplitude da gama de hospedeiros, comportamento na dispersão do vírus, fecundidade e resistência a inseticidas (Brown *et al.*, 1995). O biótipo de maior adaptação e mais ampla distribuição é o B (previamente descrito como uma espécie distinta, *B. argentifolli*) (Perring, 2001). O biótipo Q, originário da Espanha é extremamente importante e apresenta diversas similaridades com o biótipo B. O biótipo Q é atualmente o principal na Espanha, tendo se espalhando amplamente por toda a região mediterrânea (Brown, 2000; Moya *et al.*, 2001 e Marín, 2004), China (Chu *et al.*, 2001), Japão (Ueda & Brown, 2006), México, Estados Unidos, Guatemala (Brown, 2007) e Nova Zelândia (Scott *et al.*, 2007).

As tentativas de reduzir a disseminação de begomovírus em condições de campo via controle de *B. tabaci* têm sido pouco eficientes pela rapidez na transmissão do vírus pelo vetor, devido ao grande número de escapes do inseto durante as pulverizações devido a sua localização na face inferior da folha. Além disso, o controle químico do vetor é oneroso e promove impacto ambiental negativo nas áreas onde tem sido empregado. Este problema tem se agravado devido ao rápido desenvolvimento de resistência pelas diferentes populações de *B. tabaci* aos principais princípios ativos utilizados no controle químico. Neste cenário, a melhor opção para o controle dos begomovírus é o emprego de fontes de

resistência genética de amplo espectro e duráveis. Por esta razão, a busca de cultivares resistentes a begomovírus e/ou ao inseto vetor constitui um dos principais focos dos programas de melhoramento (Meagher Junior *et al.*, 1997).

As interações dos begomovírus com os biótipos de *B. tabaci* são de natureza complexa. Estas interações envolvem a circulação do vírus no corpo do inseto, em alguns casos com transmissão transovariana para a progênie, bem como efeitos marcantes na fecundidade e longevidade do inseto (Hogenhout *et al.*, 2008). Todos esses parâmetros parecem afetar a interação vírus/vetor, podendo influenciar nas taxas de disseminação das espécies de begomovírus em condições de campo. Outros fatores que podem interferir na disseminação de espécies de *Begomovirus* são decorrentes da interação vírus/planta e da interação vetor/planta. Acessos de tomateiro cultivado e de espécies selvagens foram identificados apresentando resistência a isolados de begomovírus (Ferreira *et al.*, 1999; Santana *et al.*, 2001 e Giordano *et al.*, 2005b). Foram também identificados acessos combinando resistência simultânea a begomovírus e ao inseto-vetor (Villas Bôas *et al.*, 2002), bem como, resistência exclusiva ao vetor (Channarayappa *et al.*, 1992; Barten *et al.*, 1994 e Heinz & Zalom, 1995). Dessa forma, o uso de variedades resistentes tem sido sugerido como estratégia para reduzir o potencial de inóculo no campo. O uso de plantas de tomate resistentes ao TYLCV demonstrou que a acumulação viral foi significativamente menor quando comparada com plantas suscetíveis e que a taxa de transmissão de TYLCV por *B. tabaci* também foi menor quando comparada com plantas suscetíveis (Lapidot *et al.*, 2001).

Recentemente, foi identificada a linhagem ‘TX-468-RG’ (derivada do híbrido ‘Tyking’), que apresenta resistência monogênica recessiva (gene *tcm-1*) ao begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Giordano *et al.*, 2005b). ‘TX-468-RG’ também apresentou resistência a um conjunto de espécies do ‘complexo viral’ conhecido como TYLCD, cuja resposta de resistência foi associada à limitação da acumulação sistêmica de vírus e ausência de expressão de sintomas (García-Cano *et al.*, 2008). Em termos práticos, uma redução na acumulação sistêmica viral implica em menor inóculo inicial, um dos parâmetros que afetam diretamente a curva de progresso da doença (Hull, 2002). Desta forma, a linhagem ‘TX-468-RG’ pode representar uma fonte importante de resistência à infecção por begomovírus, com reflexos potenciais também em aspectos da

epidemiologia deste grupo de vírus em condições de campo. Os objetivos do presente trabalho foram estudar os mecanismos de resistência que operam na linhagem ‘TX-468-RG’ (gene *tcm-1*), determinar os níveis de redução da acumulação viral nesta linhagem resistente e mensurar o impacto desta resistência na dispersão de TYLCV por *B. tabaci*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Local dos ensaios, material vegetal e isolado viral:** Os ensaios foram conduzidos na área experimental da Estação Experimental de ‘La Mayora’ (Algarrobo Costa, Espanha), em casa-de-vegetação e em laboratório. A linhagem ‘TX-468-RG’ foi a mesma utilizada em estudos prévios de herança da resistência a begomovírus bipartidos (Giordano *et al.*, 2005b). ‘Moneymaker’ foi utilizada como suscetível.

**Ensaio de restrição da acumulação viral mediante agroinoculação:** A acumulação de TYLCV-IL em ‘TX-468-RG’ e em ‘Moneymaker’ foi analisada através de inoculação via *Agrobacterium tumefaciens* e também via fluxo contínuo de vírus mediante enxertia sobre porta-enxertos, previamente infectados. A acumulação de TYLCV-IL em ‘TX-468-RG’ e ‘Moneymaker’ foi avaliada entre 10 e 62 dias após inoculação (dai) com o clone infectivo *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) (ES:ALM:99). Quatorze plantas de cada material foram agroinoculadas no estágio de 3-4 folhas verdadeiras (García-Cano *et al.*, 2008). Para isto, foram preparados 15 mL de meio YEP (5g/L de extrato de carne, 1 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 5 g/L de sacarose, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) acrescido de 15 µL de solução 100 mg/mL de kanamicina inoculado com 5 µL de um estoque (mantido a -20° C em 15% de glicerol). Após dois dias de incubação (28° C e com agitação contínua) o cultivo foi ajustado para uma densidade óptica de 1,0 (600 nm) (Hou *et al.*, 1998). Procedeu-se à centrifugação a 4° C durante 20 minutos a 3500 rpm e as células foram ressuspensas em uma solução 100 µM HEPES, 100 µM acetoseringona e 100 mM de MgCl<sub>2</sub> em água. Para a inoculação utilizou-se em torno de 200 µL da suspensão celular por planta, injetando o conteúdo com uma seringa de 1 mL e agulha de calibre 25 Ga nas axilas da 2° e da 3° folhas verdadeiras e mediante múltiplas punções após depositar uma gota de suspensão.

**Avaliação via escala de notas e pela detecção de DNA viral via hibridização molecular:**

As plantas inoculadas foram avaliadas aos 10, 14, 24, 30, 45 e 62 dias após inoculação (DAI). A escala de notas utilizada foi similar à escala proposta por Lapidot *et al.* (2006) onde: 0 = ausência de sintomas; 1 = sintomas incipientes; 2 = encarquilhamento das margens dos folíolos das folhas superiores; 3 = encarquilhamento dos folíolos das folhas superiores e intermediárias e amarelecimento; 4 = encarquilhamento dos folíolos das folhas ao longo de toda a planta, amarelecimento e atraso no crescimento e, 5 = encarquilhamento dos folíolos de todas as folhas da planta, redução da lâmina foliar, amarelecimento e paralisação do crescimento da planta. Para a detecção viral via hibridização foi adotado um protocolo similar ao descrito por Accotto *et al.* (2000). A segunda ou terceira folha a partir do ápice foi removida (duas repetições por planta) e os ácidos nucléicos imobilizados em membrana de náilon carregada positivamente (Nylon<sup>+</sup>, Roche Diagnostics). Plantas de tomate ‘MoneyMaker’ (suscetível) sadias e infectadas foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os ácidos nucléicos das amostras foram fixados à membrana mediante tratamento com luz ultravioleta (Crosslinker, mod. RPN 2500, Amersham Life Science) e a membrana foi hibridizada com sonda de DNA marcada com digoxigenina. Foi utilizada uma sonda específica para a região intergênica de TYLCV-IL. O procedimento de hibridização e detecção por quimioluminescência foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (‘DNA labelling and detection kit’). As membranas foram lavadas e expostas a filme de raio-X em diferentes tempos de exposição.

**Extração de ácidos nucléicos totais:** Para extração de ácidos nucléicos totais (ANT), 100 mg de tecido vegetal fresco ou previamente congelado a -70° C foram colocados em tubos de 1,5 mL em recipiente contendo nitrogênio líquido. A seguir procedeu-se à maceração em 300 µL de tampão de extração TLES (5% SDS, 150 mM LiCl, 50 mM Tris-HCl, pH 9,0 e 50 mM EDTA) efetuando-se duas extrações em fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), cada uma seguida por 10 minutos de centrifugação a 12000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 15 µL de acetato de sódio 4M e 750 µL de etanol frio. Depois de 30 minutos a -20° C foi feita uma centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol 70% e os ácidos nucléicos foram ressuspensos em 100 µL de Tris-EDTA (TE). As amostras foram quantificadas e as

concentrações padronizadas para aplicação em membrana, seguindo diluições de 1/2, 1/4, 1/8 até 1/2048. Foram preparadas duas réplicas de cada membrana, uma para hibridização com sonda para TYLCV-IL e a outra para controle de carga, sendo hibridizada com uma sonda obtida para um fragmento do gene que codifica para o RNA ribossômico 18S (18S rRNA). A presença de DNA viral foi detectada via hibridização molecular (Accotto *et al.*, 2000), conforme descrito anteriormente.

**Ensaio de restrição da acumulação viral mediante enxertia sobre porta-enxerto infectado (fluxo contínuo de vírus):** Plantas de ‘TX-468-RG’ e ‘Moneymaker’, com 3-4 folhas, foram agroinoculadas com o clone infectivo de TYLCV-IL via *A. tumefaciens* e mantidas em casa-de-vegetação livre de mosca-branca. Quatorze dias após inoculação, as plantas foram analisadas por hibridização molecular de pecíolos de folhas apicais. Plantas de ‘TX-468-RG’ e ‘Moneymaker’ que apresentaram sinal positivo na hibridização foram selecionadas para servirem como porta-enxerto em diferentes combinações. Plantas usadas como enxertos também foram analisadas para a presença de TYLCV-IL. Foram feitas enxertias de plantas de ‘Moneymaker’ não infectadas sobre ‘Moneymaker’ e ‘TX-468-RG’ infectadas e, plantas de ‘TX-468-RG’ não infectadas sobre ‘Moneymaker’ e ‘TX-468-RG’ infectadas. Os enxertos foram mantidos em ambiente úmido e sombreado, durante sete dias. Aos 14, 21 e 28 dias após a enxertia os sintomas foram avaliados utilizando-se escala de notas citada anteriormente e por hibridização. Aos 28 dias realizou-se extração de ácidos nucléicos totais (ANT), onde, após quantificação e padronização das concentrações procedeu-se à aplicação das amostras (em diluições seriadas) em membrana. Os procedimentos de hibridização e diluições foram seguidos conforme descrito anteriormente. Este ensaio foi conduzido em duas épocas.

**Estudo epidemiológico de ‘TX-468-RG’ na dispersão primária de TYLCV-IL:** Para os ensaios de transmissão natural pelo vetor, tanto de dispersão primária quanto de dispersão secundária, foram utilizados adultos de *B. tabaci* biótipo Q, coletados em colônias avirulíferas, mantidas em plantas isoladas de melão (*Cucumis melo* L.). As condições nesta casa-de-vegetação eram de 25-30° C durante o dia e 18-20° C durante a noite, sendo usado suplemento de luz para manter um fotoperíodo de 16 horas. Para realização dos ensaios de



dispersão primária (dispersão de vírus após a introdução de moscas virulíferas) foram utilizadas plantas de tomate ('MoneyMaker') como fonte de aquisição previamente agroinoculadas com o clone de TYLCV-IL 20-25 dias antes de sua utilização. A infecção das plantas foram confirmadas mediante hibridização molecular. Foram colocadas duas plantas por caixa e o dobro de moscas avirulíferas necessárias para o ensaio (2000 moscas-brancas). O período de acesso de aquisição (PAA) adotado foi de 48 horas. Após este período, (15 moscas/planta) foram transferidas para tubos de 50 mL. A dispersão primária de TYLCV-IL foi estudada depois da liberação por 48 h (período de acesso de inoculação PAI), de 15 moscas adultas virulíferas por planta em telados contendo plantas saudas (com 4-7 folhas verdadeiras) de 'MoneyMaker' ou de 'TX-468-RG'. Foram conduzidos ensaios de não eleição e mistura de ambos os genótipos em uma proporção de 1:1 (ensaio de livre eleição). Nos ensaios de não eleição foram usadas 22 plantas de cada genótipo, e naqueles de livre eleição alternou-se 11 plantas de cada material genético. As moscas virulíferas foram liberadas no ponto central do círculo. Moscas-brancas avirulíferas (na quantidade 15 moscas/planta de 'MoneyMaker') foram utilizadas como controles. Foram analisadas três repetições deste ensaio. Depois do período de transmissão, as plantas inoculadas foram tratadas com o inseticida Imidacloprid 20% p/v (Confidor 20 Ls. Bayer CropScience) e transferidas para outra casa-de-vegetação livre de mosca-branca. As avaliações de sintomas e as hibridizações foram feitas aos 7, 10, 14, 21 e 28 dias após eliminação das moscas, conforme descrito anteriormente.

#### **Estudo epidemiológico de 'TX-468-RG' na dispersão secundária de TYLCV-IL:**

Estudou-se a dispersão secundária de TYLCV-IL (dispersão de vírus a partir de plantas infectadas para plantas saudas) mediante a liberação de moscas não virulíferas (dosagem de 30 moscas por planta), por 96 h, em telados contendo plantas de 'TX-468-RG' ou 'MoneyMaker' infectadas de acordo com o desenho experimental da Figura 1. Para realização deste ensaio, foram utilizadas inicialmente como fonte de aquisição plantas de tomate ('MoneyMaker' e 'TX-468-RG') previamente infectadas por agroinoculação com o clone de TYLCV-IL, 16 dias antes de sua utilização. A confirmação da infecção foi feita mediante hibridização molecular. Foram utilizados cinco telados, com três plantas infectadas dispostas de maneira equidistante no centro de cada círculo. Para verificar a dispersão

secundária de vírus a partir da cultivar suscetível, utilizaram-se 3 plantas infectadas da cv 'Moneymaker' no centro para 22 plantas não infectadas de 'Moneymaker' e também (em outro telado) para 22 plantas não infectadas de 'TX-468-RG'. A dispersão secundária de vírus foi estudada também a partir da linha resistente 'TX-468-RG'. Para isto utilizaram-se três plantas infectadas de 'TX-468-RG' no centro, para 22 plantas não infectadas de 'TX-468-RG' e também (em outro telado) para 22 plantas não infectadas de 'Moneymaker'. Plantas da cv. 'Moneymaker' não infectadas, ao centro para plantas de 'Moneymaker' não infectadas usando também 30 moscas-brancas avirulíferas por planta, foram usadas como controle negativo (Figura 1). Estimou-se 48 h para PAA e PAI totalizando 96 h de contato entre insetos de *B. tabaci* e as plantas infectadas e não infectadas. Depois deste período de 96 h, as plantas inoculadas foram tratadas com o inseticida Imidacloprid 20% p/v (Confidor 20 Ls. Bayer CropScience) e transferidas para outra casa-de-vegetação livre de mosca-branca. As avaliações de sintomas e hibridizações foram feitas aos 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento para *B. tabaci* conforme descrito anteriormente.

## RESULTADOS

**Ensaio de restrição da acumulação viral mediante agroinoculação (fluxo pontual de vírus):** A resistência presente em 'TX-468-RG' manifestou-se pela limitação na acumulação viral e ausência de sintomas (Figura 2). A quantificação de TYLCV-IL presente em folíolos apicais mediante hibridização molecular de diluições seriadas de ácidos nucléicos totais foi realizada aos 10, 14, 24, 30, 45 e 62 dias após inoculação (DAI) de TYLCV-IL partindo-se de concentrações de 100 ng/μL aos 10, 14 e 45 dias, 150 ng/μL aos 30 e 62 dias 200 ng/μL aos 24 dias. Como controle de carga da hibridização utilizou-se uma sonda para o RNA ribossômico 18S (Figura 3). Nestes ensaios foi detectada (até os 45 dias) uma acumulação viral 8X menor em 'TX-468-RG' quando comparado a 'Moneymaker'. Os níveis de acumulação viral em 'TX-468-RG' foram quatro vezes menor do que os observados em 'Moneymaker' aos 62 DAI.

**Ensaio de restrição da acumulação viral mediante enxertia em porta-enxerto infectado (fluxo contínuo de vírus):** Para determinar se a resistência conferida por 'TX-

468-RG' a TYLCV-IL impede a translocação do vírus a longa distância foram conduzidos ensaios de enxertia. Como controle utilizou-se porta-enxertos de plantas não infectadas de 'MoneyMaker' e 'TX-468-RG'. Observou-se uma baixa acumulação viral na parte apical de 'TX-468-RG' em todas as épocas analisadas (14, 21 e 28 dias após enxertia) inclusive no fornecimento contínuo de vírus mediante enxerto sobre plantas infectadas com TYLCV-IL, utilizando-se tanto plantas infectadas de 'MoneyMaker' quanto de 'TX-468-RG' como fontes de vírus (Figura 4).

**Estudo epidemiológico de 'TX-468-RG' na dispersão primária de TYLCV-IL:** A dispersão primária de TYLCV-IL foi estudada depois da liberação de 15 moscas virulíferas por planta durante um período de 48 h em telado contendo plantas não infectadas de 'MoneyMaker' ou 'TX-468-RG' (ensaio de não eleição) ou misturas de ambos os acessos na proporção de 1:1 (ensaio de livre eleição). Em testes de livre eleição, a porcentagem de plantas infectadas em 'MoneyMaker' foi correspondente a 54% aos sete dias e 82% aos 28 dias. Na linhagem 'TX-468-RG' somente se detectaram plantas positivas (20%) aos 21 dias. Em testes de não eleição, aos 28 dias depois da inoculação, somente 41% das plantas de 'TX-468-RG' se infectaram, enquanto em plantas da cultivar suscetível este valor foi de 91% de plantas infectadas. (Figura 5).

**Estudo epidemiológico de 'TX-468-RG' na dispersão secundária de TYLCV-IL:** A dispersão secundária de TYLCV-IL foi estudada mediante a liberação de 30 moscas-brancas avirulíferas durante um período de 96 h em telados que continham plantas de 'MoneyMaker' e 'TX-468-RG' infectadas e dispostas ao centro de um círculo contendo 22 plantas não infectadas (Figura 3). Foi observada (aos 28 dias após inoculação) uma redução na frequência de plantas infectadas por TYLCV-IL na cultivar suscetível 'MoneyMaker' e ausência de plantas infectadas na linhagem 'TX-468-RG' em experimentos em que foram utilizadas plantas infectadas de 'TX-468-RG' como fontes de inóculo. Quando plantas de 'MoneyMaker' foram utilizadas como fonte de inóculo observou-se mais de 90% e 40% de plantas de 'MoneyMaker' e 'TX-468-RG' infectadas respectivamente (Figura 6).

## DISCUSSÃO

O uso de cultivares com resistência genética tem sido a mais efetiva estratégia para minimizar as perdas causadas por doenças virais, incluindo patossistemas envolvendo espécies de *Begomovirus* (Fraser, 1990 e Picó *et al.*, 1996). Os vírus são patógenos que necessitam da maquinaria celular da hospedeira para replicarem e completarem seu ciclo biológico (Hull, 2002). Existe uma série de interações compatíveis entre vírus/hospedeira que permitem ao vírus replicar-se e movimentar-se a curtas e longas distâncias. Durante o processo de evolução e diversidade genética da planta hospedeira, entretanto, mecanismos capazes de alterar processos específicos do ciclo infectivo podem ser produzidos e, eventualmente, resultar em resposta de resistência ou tolerância, restringindo ou reduzindo a carga/título viral em tecidos hospedeiros (Fraser, 1990).

No patossistema tomate/begomovírus, títulos virais diferentes podem ser observados dependendo do órgão infectado, da posição na planta, do tempo transcorrido desde o início do processo de infecção e também da constituição genética da planta hospedeira. Em cultivares suscetíveis, a replicação viral e a translocação antecedem o aparecimento de sintomas típicos de begomovírus por dias ou semanas (Wege & Pohl, 2007). No entanto, em cultivares resistentes, a replicação e translocação podem se manifestar de maneira quase latente com a produção de sintomas atenuados e/ou com atraso temporal quando comparado com plantas suscetíveis (Rom *et al.*, 1993 e Picó *et al.*, 1996).

A resistência recessiva monogênica (gene *tcm-1*) identificada na linha ‘TX-468-RG’ (Giordano *et al.*, 2005b) é derivada do híbrido ‘Tyking’, cuja origem genética não é plenamente conhecida (Laterrot, 1995). Outra fonte de resistência recessiva (gene *tgr-1*) é a linhagem ‘FLA-653’ (Bian *et al.*, 2007) que foi também derivada de cruzamentos envolvendo ‘Tyking’ e *S. chilense* (‘LA-2779’). Bian *et al.* (2007) observaram uma menor quantidade de DNA viral em folhas de ‘FLA-653’ inoculadas localmente, quando comparado à cultivar suscetível. Foi também observado o bloqueio da translocação viral a longas distâncias, semelhante ao que ocorre no híbrido ‘Tyking’ por Fargete *et al.* (1996). García-Cano *et al.* (2008) identificaram uma limitação da acumulação sistêmica viral e ausência de sintomas como a expressão fenotípica mais marcante da resistência conferida pela linhagem ‘TX-468-RG’. Estes resultados foram confirmados no presente trabalho (Figura 2) onde se observou um menor número de plantas infectadas, atraso no

desenvolvimento da infecção e menor acumulação de DNA viral em ‘TX-468-RG’ oito vezes menor que em ‘Moneymaker’ até os 45 DAI.

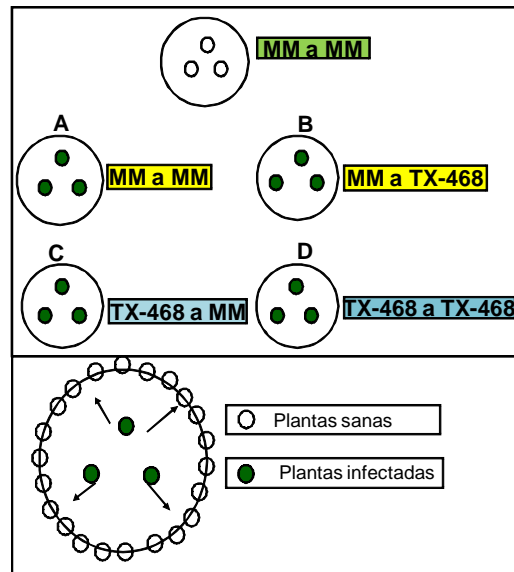
Ensaio também foram conduzidos para determinar se a resistência conferida por ‘TX-468-RG’ a TYLCV-IL impede a translocação viral a longas distâncias dentro dos tecidos da planta. O movimento do vírus célula-a-célula é uma etapa necessária para acumulação viral sistêmica e desenvolvimento de sintomas e o fenômeno de restrição à invasão sistêmica pode resultar do bloqueio físico do vírus para entrada no floema, ou pela inibição de fatores requeridos pelo vírus para o movimento, ou ainda limitação do movimento viral no floema causado por um sinal produzido pelo reconhecimento do vírus pela hospedeira (Hull, 2002). Existem diversos exemplos descritos na literatura cujo mecanismo de resistência é o resultado da interferência no movimento a longas distâncias, incluindo linhagens de milho resistentes a *Maize dwarf mosaic virus* (Lei & Agrios, 1986) e linhagens de tomateiro com ‘locus’ *Ty-1* (Michelson *et al.*, 1994 e Vidavski *et al.*, 1998) e *tgr-1* (Bian *et al.*, 2007) a distintas espécies de *Begomovirus*. Nossos resultados indicam redução na acumulação viral na porção apical das plantas de ‘TX-468-RG’ em todas as épocas analisadas (aos 14, 21 e 28 dias após enxertia). Esta característica é, aparentemente, muito estável, sendo também observada em situação de fluxo contínuo de vírus mediante enxerto em plantas infectadas com TYLCV-IL, (Figura 4). Este resultado foi observado nas duas épocas em que se realizou este ensaio.

A presença de menor número de plantas infectadas e de menor acumulação viral na linhagem ‘TX-468-RG’ estimulou à condução de novos ensaios visando verificar o impacto da resistência na dispersão de TYLCV-IL por *B. tabaci*. Este aspecto é importante uma vez que a incidência de ‘begomoviroses’ relaciona-se diretamente com a densidade populacional de moscas-brancas. Em termos práticos, a redução na acumulação sistêmica viral de linhagens resistentes pode implicar em menor *yo* (inóculo inicial) o que pode afetar diretamente a curva de progresso da doença. Desta forma, o impacto na dispersão de TYLCV-IL foi analisado em ensaios comparativos entre a linha ‘TX-468-RG’ (resistente) e ‘Moneymaker’ (suscetível). Para os estudos do efeito da resistência na dispersão primária foram conduzidos testes de livre escolha, onde as moscas virulíferas tiveram acesso aos dois genótipos, enquanto que em testes de não escolha, o acesso das moscas foi limitado a um genótipo por vez. A análise da presença de TYLCV-IL em plantas mediante hibridização

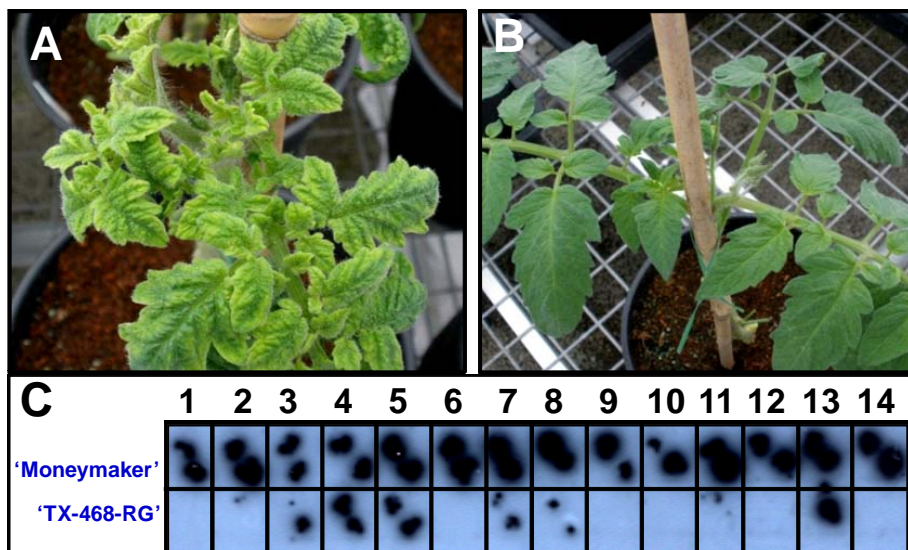
molecular mostrou incidência de TYLCV-IL claramente inferior em ‘TX-468-RG’ comparado ao controle suscetível ‘Moneymaker’, mais acentuada nos ensaios de livre eleição. Em ‘TX-468-RG’ a presença do vírus só foi detectada aos 21 dias após o término do período de transmissão, enquanto em ‘Moneymaker’ detectou-se 55% de plantas infectadas aos 10 dias após o término do período de transmissão (Figura 5). Aos 28 dias depois da inoculação em ensaios de não escolha, somente 41% das plantas de ‘TX-468-RG’ estavam infectadas enquanto em plantas da cultivar suscetível este valor foi de 91%.

A dispersão secundária de TYLCV-IL foi estudada mediante a liberação de 30 moscas-brancas avirulíferas (durante um período de 96 h) em telados. Aos 28 dias depois da inoculação, observou-se que plantas de ‘TX-468-RG’ (quando usadas como fontes de inóculo de TYLCV-IL) restringiram a infecção tanto para plantas de ‘Moneymaker’ (controle suscetível) quanto para plantas da linhagem ‘TX-468-RG’ (que apresentou 100% de plantas livres do vírus planta). Desta forma, plantas de ‘TX-468-RG’, mesmo infectadas, foram menos eficientes como fonte de inóculo quando comparadas com a cultivar suscetível (Figura 6). Resultados semelhantes, de menor eficiência na transmissão após aquisição viral em fontes resistentes, foi observado por Lapidot *et al.* (2001).

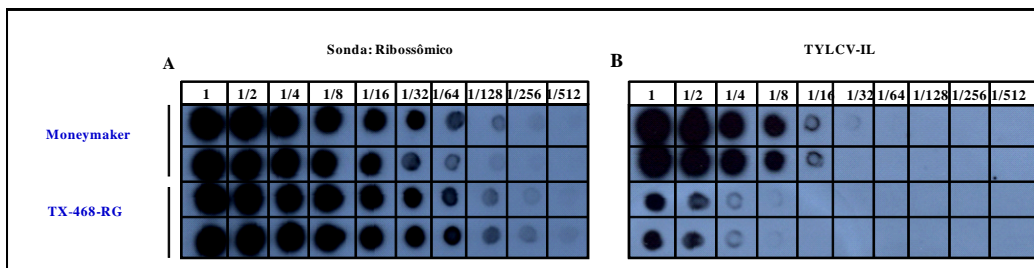
Em conclusão, a resistência de ‘TX-468-RG’ se manifesta por uma restrição na acumulação de TYLCV-IL, inclusive em condições de fornecimento contínuo de vírus. Desta forma, o uso desta linhagem reduz a dispersão primária e secundária de TYLCV-IL a partir de plantas eventualmente, infectadas. Como ‘TX-468-RG’ também demonstrou ser resistente a espécies de begomovírus bipartidos (Giordano *et al.*, 2005b) devido a não manifestação de sintomas e redução da acumulação viral, o mesmo impacto epidemiológico é esperado no manejo de begomovírus bipartidos empregando-se essa fonte de resistência.



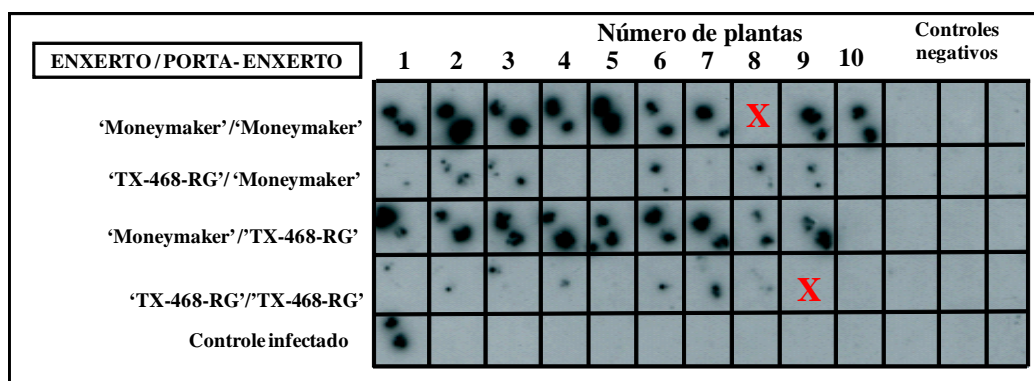
**Figura 1** - Desenho experimental utilizado e esquema da disposição de plantas nos ensaios de dispersão secundária utilizando o acesso de tomate suscetível ‘Moneymaker’ (MM) e acesso resistente ‘TX-468-RG’. Plantas de ‘Moneymaker’ (MM) ao centro funcionando como fontes de inóculo para plantas de ‘Moneymaker’ (MM) (A) ou plantas de ‘TX-468-RG’ (B) e Plantas de ‘TX-468-RG’ como fontes de inóculo para plantas de ‘Moneymaker’ (C) (MM) ou plantas de ‘TX-468-RG’ (D).



**Figura 2** - Plantas de ‘Moneymaker’ (A) e de ‘TX-468-RG’ (B) inoculadas com TYLCV-IL (C) Detecção de TYLCV-IL em plantas de ‘Moneymaker’ (cultivar suscetível) e ‘TX-468-RG’ com base em hibridização molecular de pecíolos de folha apical aos 24 dias após inoculação (DAI).

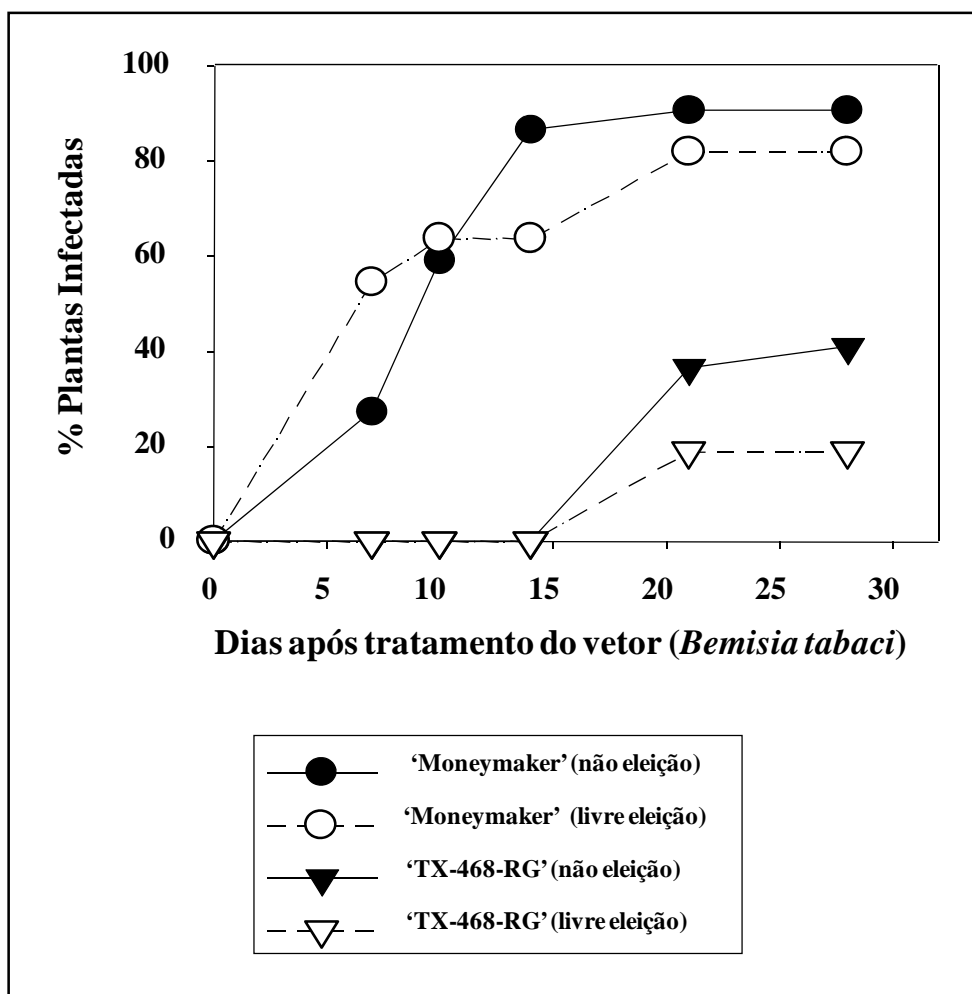


**Figura 3** - Hibridização com sonda para 18S rRNA (A) ou para TYLCV-IL (B) de diluições seriadas de extratos de ácidos nucléicos totais obtidos a partir de folhas apicais de plantas analisadas aos 24 dai.

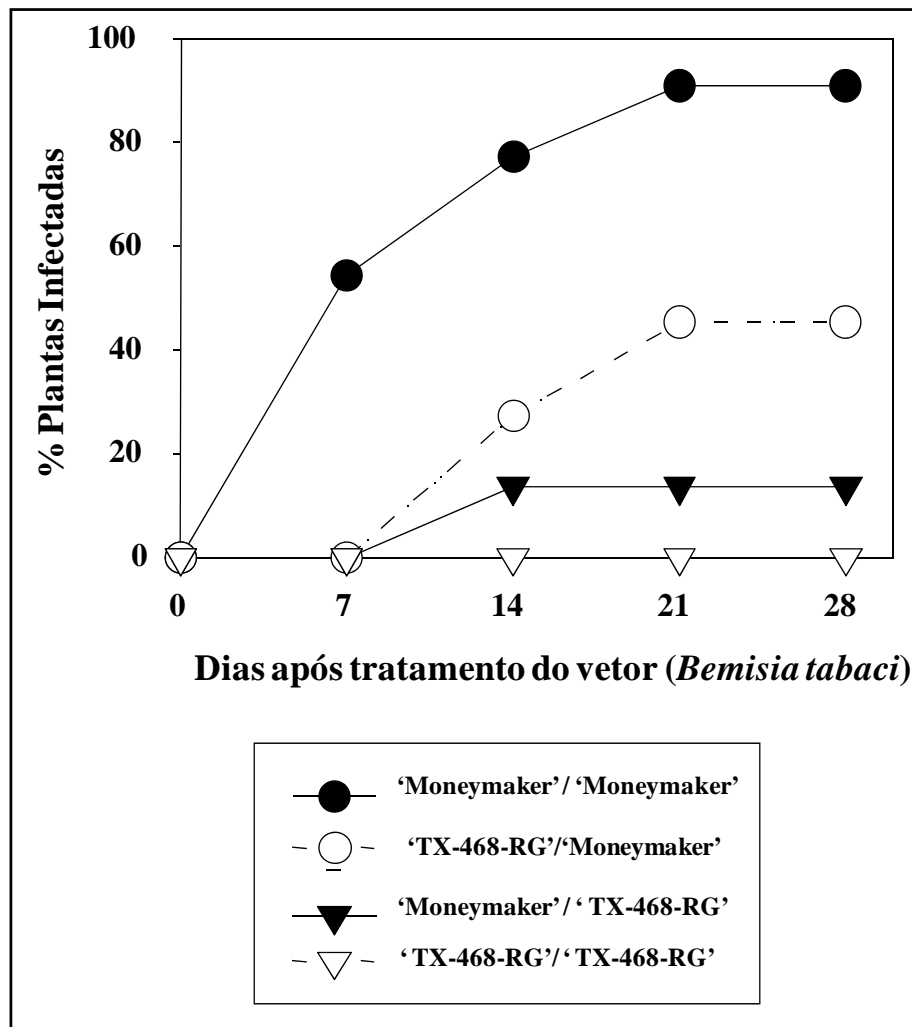


**Figura 4** - Detecção de TYLCV-IL por hibridização molecular de peciols de folhas apicais de plantas de 'Moneymaker' e 'TX-468-RG' enxertadas sobre porta-enxertos infectados (28 dias após enxertia). X = Enxertos perdidos.





**Figura 5** - Porcentagem de plantas infectadas em 'Moneymaker' e 'TX-468-RG' aos 7, 10, 14, 21 e 28 dias após tratamento das moscas-brancas virulíferas em ensaios de dispersão primária.



**Figura 6** - Incidência de plantas infectadas com TYLCV-IL em 'MoneyMaker' e 'TX-468-RG' aos 7, 14, 21 e 28 após tratamento das moscas-brancas não-virulíferas em ensaios de dispersão secundária.

## CAPÍTULO 6

**Análise do padrão de segregação da resistência de famílias  $F_{2:3}$  derivadas de ‘Tyking’ frente à espécie de begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL)**

## RESUMO

A linhagem de tomate (*Solanum lycopersicum*) 'TX-468-RG' (derivada da autofecundação do híbrido 'Tyking') tem sido identificada como fonte de amplo espectro de resistência contra diferentes espécies de *Begomovirus* bipartidos no Brasil e contra um conjunto de espécies de *Begomovirus* monopartidos do 'complexo viral' denominado 'Tomato yellow leaf curl disease' (TYLCD). A expressão fenotípica da resistência foi caracterizada pela ausência de sintomas e reduzida translocação e acumulação sistêmica de DNA viral. Estudos de herança da resistência à infecção por begomovírus foram realizados em população segregante F<sub>2</sub>, frente ao bipartido *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) utilizando inoculação com uma população virulífera de *Bemisia tabaci* e indicaram um modelo monogênico recessivo (gene *tcm-1*). Estudos adicionais foram conduzidos também com uma geração F<sub>2</sub> para estudar a herança da resistência da linhagem 'TX-468-RG' ao monopartido *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) e indicaram uma resistência recessiva, mas com provável interação de genes de efeitos epistáticos. Estes dados, aparentemente em discrepância, podem ser explicados por diferenças na espécie viral, estrutura das populações avaliadas e método de inoculação. O presente trabalho teve como objetivo gerar dados para posterior comparação de fatores genéticos associados com a resistência da linhagem 'TX-468-RG' frente a espécies de *Begomovirus* monopartidos e bipartidos. Foram realizados testes de progênes de 171 famílias F<sub>2,3</sub> derivadas do cruzamento 'Ohio 8245' (suscetível) x 'TX-468-RG' (resistente) e o sistema de agroinoculação com um clone infectivo de TYLCV-IL. Todas as plantas da geração F<sub>1</sub> mostraram sintomas severos de infecção, similares aos observados para o parental suscetível 'Ohio 8245'. Os valores de distribuição do teste de qui-quadrado confirmaram o modelo de segregação 1:2:1 e a hipótese de herança monogênica recessiva (41 famílias de plantas homocigotas resistentes, 87 famílias de plantas heterocigotas suscetíveis e 43 famílias de plantas homocigotas suscetíveis). A análise de 16 plantas dentro de cada família permitiu confirmar a segregação 3:1 (indivíduos suscetíveis e resistentes) em todas as famílias heterocigotas suscetíveis avaliadas. Desta forma, os resultados das avaliações fenotípicas das famílias F<sub>2,3</sub> frente às TYLCV-IL permitem confirmar uma herança monogênica recessiva, minimizando a possibilidade de efeitos de outros genes epistáticos. Estudos adicionais serão conduzidos com esta amostra de famílias

F<sub>2:3</sub> frente a espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido visando confirmar se a resistência às espécies brasileiras bipartidas e ao TYLCV-IL é controlada pelo mesmo gene recessivo (*tcm-1*) ou por outro(s) gene(s) em ligação estreita. Do ponto de vista do melhoramento genético, a confirmação da herança monogênica recessiva vai permitir acelerar o processo de incorporação deste gene em linhagens e cultivares elite de tomate.

**Palavras-chave:** herança, resistência, begomovírus, tomate, melhoramento genético

## INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae*, considerada a mais numerosa dentre os vírus de plantas está representada pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* de acordo com a gama de hospedeiros, o tipo de vetor, a organização do genoma e o relacionamento filogenético (Van Regenmortel *et al.*, 2000 e Fauquet *et al.*, 2008). Os vírus desta família apresentam DNA circular de fita simples encapsidados em partículas geminadas e de morfologia icosaédrica, com um ou dois componentes genômicos denominados DNA-A e DNA-B. Dentre os gêneros da família, *Begomovirus* é o mais importante contando com uma grande diversidade de espécies virais que infectam uma ampla gama de hospedeiras (Freitas-Astúa *et al.*, 2002 e Varma & Malathi *et al.*, 2003). As espécies de *Begomovirus* são transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* Genn. (família *Aleyrodidae*). Este inseto possui hábito alimentar polífago (Brown *et al.*, 1995) e se encontra amplamente distribuído em todas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Harrison, 1985; Perring *et al.*, 1993; Brown, 1994 e Polston & Anderson 1999).

A diversidade de espécies de *Begomovirus* que infectam o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e a severidade dos sintomas que estes patógenos induzem, faz com que este gênero de vírus seja considerado o principal problema econômico desta hortaliça no mundo (Brown *et al.*, 1995 e Seal *et al.*, 2006). O ‘complexo viral’ de espécies conhecido como ‘Tomato yellow leaf curl disease’ (TYLCD) tem causado severos prejuízos econômicos e ambientais na região do mediterrâneo e Oriente Médio. Atualmente, as espécies do ‘complexo viral associado ao TYLCD’ encontram-se distribuídas em regiões das Américas, África e Ásia (Czosnek *et al.*, 1990; Ascencio-Ibanez *et al.*, 1999; Momol *et al.*, 1999; Moriones & Navas-Castillo 2000; Valverde *et al.*, 2001 e Marín, 2004). Na

Espanha, a presença de begomovírus em cultivos de tomate foi relatada pela primeira vez em 1992, associada com a ampla disseminação de *B. tabaci* (Moriones *et al.*, 1993). Desde então, epidemias de TYLCD associadas a diferentes espécies foram reportadas como responsáveis por importantes perdas nos cultivos de tomate constituindo o principal fator limitante para a produção dessa hortaliça em todo Sul e Sudeste da Península Ibérica, Baleares e Canárias (Monci *et al.*, 2000 e Font *et al.*, 2000a, b). No Brasil, até o presente momento, todas as espécies relatadas são de begomovírus bipartidos, característicos do Novo Mundo.

A melhor opção para o controle de begomovírus é o emprego de cultivares resistentes ao vírus e/ou ao vetor, sendo que a incorporação de genes de resistência em cultivares comerciais é considerada a estratégia mais segura para evitar perdas econômicas causadas por vírus (Fraser, 1990 e Picó *et al.*, 1996). A busca por fontes de resistência foi iniciada na espécie cultivada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), na qual não se encontraram níveis aceitáveis de resistência (Picó *et al.*, 1996). Sendo assim, os programas de melhoramento tem se baseado na introgressão de genes encontrados em espécies selvagens de *Solanum*. As melhores fontes tem sido *Solanum pimpinellifolium* L., *Solanum habrochaites* S.Knapp & D.M. Spooner, *Solanum peruvianum* L. e *Solanum chilense* (Dunal) Reiche (Picó *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 1999; Picó *et al.*, 1999; Pilowsky & Cohen, 2000 e Santana *et al.*, 2001) apresentando diferentes modelos responsáveis pelo controle genético de resistência.

A resistência a begomovírus bipartidos, presente na linha de *S. lycopersicum* ‘TX-468-RG’, a qual incorpora a resistência de ‘Tyking’ em uma base genética da cultivar suscetível ‘Ohio 8245’, foi relatada por Santana *et al.* (2001). Essa resistência expressa-se como ausência de sintomas e uma baixa detecção de DNA viral em condições de infecção por *B. tabaci*. ‘Tyking’ originalmente, é um híbrido que foi cultivado como resistente ao begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus*, cuja fonte de resistência permanece desconhecida (Laterrot, 1995). Estudos realizados frente ao begomovírus bipartido ToCMoV, indicaram que a resistência presente em ‘TX-468-RG’ apresenta herança recessiva monogênica e o gene responsável por esta resistência foi denominado *tcm-1* (Giordano *et al.*, 2005b).

Esta linha apresenta ainda ampla resistência a begomovírus monopartidos e estudos de herança frente ao *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) indicaram tratar-se de uma resistência recessiva com interação de genes de efeitos epistáticos, manifestando-se na ausência de sintomas e diminuição da acumulação viral nas plantas infectadas (García-Cano *et al.*, 2008). Destaca-se também que, além do TYLCV-IL, a linhagem ‘TX-468-RG’ apresentou o mesmo nível de resistência a outras espécies virais monopartidas integrantes do ‘complexo viral TYLCD’.

Os estudos genéticos empregando testes de progênies de famílias  $F_{2:3}$  apresentam poder analítico mais robusto dos padrões de segregação se comparado com ensaios típicos de análise de gerações. Neste sistema, um número maior de plantas derivadas de indivíduos  $F_2$  é analisado em conjunto, permitindo uma classificação fenotípica mais refinada que aquela obtida com a análise direta de um único indivíduo  $F_2$ . A análise individual de plantas  $F_2$  torna-se especialmente problemática em sistemas de inoculação sujeito a apresentar escapes e/ou utilizando estratégias de inoculação de difícil padronização da quantidade de inóculo por planta. Além disso, no caso específico de características monogênicas, os testes de progênies  $F_{2:3}$  permitem a classificação fenotípica completa de indivíduos  $F_2$  e auxilia na elucidação do número de genes e modo de herança da característica em estudo. Este trabalho foi conduzido mediante agroinoculação de 171 famílias  $F_{2:3}$  com TYLCV-IL, visando gerar informações que permitam, posteriormente, comparar os determinantes genéticos que controlam a resistência da linhagem ‘TX-468-RG’ a espécies de *Begomovirus* monopartidos e bipartidos. Para que isto seja possível, em uma segunda etapa deste trabalho, ensaios serão conduzidos utilizando estas mesmas famílias em condições de casa-de-vegetação da Embrapa Hortaliças (CNPq) no Brasil e uma espécie de begomovírus bipartido, através da inoculação com clones infectivos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Avaliação de famílias  $F_{2:3}$  (‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’) avaliadas frente à *Tomato yellow leaf curl virus-Israel*:** Ensaios foram conduzidos na área experimental da Estação Experimental de ‘La Mayora’ (Algarrobo Costa, Espanha) em casa-de-vegetação. Este ensaio utilizou 171 famílias (16 plantas por família) englobando a análise de um total de

2736 indivíduos segregantes. Os controles utilizados foram 16 plantas de ‘Moneymaker’ (testemunha suscetível), 16 plantas dos parentais ‘Ohio 8245’ (suscetível) e ‘TX-468-RG’ (resistente) e 16 plantas da geração F<sub>1</sub> proveniente do cruzamento de ‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’. As plantas dos parentais, F<sub>1</sub>, testemunha suscetível e das famílias F<sub>2,3</sub> foram agroinoculadas (via *A. tumefaciens*) no estágio de 3-4 folhas verdadeiras (Figura 1), conforme descrito por García-Cano *et al.* (2008). O clone infectivo utilizado foi *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL ES:ALm:99). Foram utilizados como controle negativo um grupo de plantas não inoculadas dos dois parentais, de F<sub>1</sub> e da cultivar ‘Moneymaker’ (16 plantas em cada grupo).

**Avaliação de sintomas via escala de notas e detecção de DNA viral via hibridização molecular:** As plantas inoculadas foram avaliadas aos 25, 35 e 43 dias após inoculação (DAI), mediante escala de notas variando de 0 até 5, similar a Lapidot *et al.* (2006), onde: 0 = ausência de sintomas; 1 = sintomas incipientes; 2 = encarquilhamento das margens dos folíolos das folhas superiores; 3 = encarquilhamento dos folíolos das folhas superiores e intermediárias e amarelecimento; 4 = encarquilhamento dos folíolos das folhas ao longo de toda a planta, amarelecimento e atraso no crescimento e, 5 = encarquilhamento dos folíolos de todas as folhas da planta, redução da lâmina foliar, amarelecimento e paralisação do crescimento da planta. A detecção viral nos tecidos das plantas dos controles utilizados (inoculados e não inoculados) foi realizada via hibridização adotando-se um protocolo similar ao descrito por Accotto *et al.* (2000). A segunda ou terceira folha a partir do ápice foi removida (duas repetições por planta) e os ácidos nucléicos foram imobilizados em membrana de náilon carregada positivamente (Nylon<sup>+</sup>, Roche Diagnostics). Plantas de tomate sadias e plantas da cultivar ‘Moneymaker’ (suscetível) infectada foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os ácidos nucléicos das amostras foram fixados à membrana mediante tratamento com luz ultravioleta (Crosslinker, mod. RPN 2500, Amersham Life Science) e as membranas foram hibridizadas com sondas de DNA marcado com digoxigenina específica para a região intergênica de TYLCV-IL. O procedimento de hibridização e detecção por quimioluminescência foi realizado seguindo o protocolo de Roche Diagnostics (‘DIG-DNA Labelling and Detection kit’). As membranas foram lavadas e expostas a filme de raio-X e reveladas após diferentes tempos de exposição.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as plantas de ‘Moneymaker’ (controle suscetível) e do parental suscetível ‘Ohio 8245’ mostraram sintomas severos de infecção, indicando a eficiência do método de agroinoculação. Todas as plantas da geração F<sub>1</sub> (‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’) apresentaram sintomas típicos de infecção viral aos 25 dias após a inoculação (dai), similar aos observados para ‘Moneymaker’ e para o parental suscetível. A análise com hibridização molecular indicou que 100% de plantas estavam positivas, apresentando títulos virais elevados nos tecidos infectados. As plantas da linhagem resistente ‘TX-468-RG’ apresentaram-se assintomáticas, no entanto, 81,3 % das plantas analisadas por hibridização molecular foram positivas aos 25 dai. Não foram detectadas plantas sintomáticas e/ou positivas mediante hibridização molecular nos controles negativos, indicando ausência de moscas-brancas virulíferas durante o ensaio e a consequente ausência de infecções secundárias e/ou presença de outras espécies de *Begomovirus* monopartidos (Figuras 2 e 3), o que poderiam afetar a uniformidade do ensaio.

Os resultados de fenotipagem de 16 indivíduos por família permitiram identificar 41 famílias homozigotas resistentes, 87 famílias heterozigotas suscetíveis e 43 famílias homozigotas suscetíveis. Na Tabela 1 encontra-se uma visão geral dos resultados obtidos com a fenotipagem das 171 famílias avaliadas. A análise de 16 plantas dentro de cada família permitiu confirmar o padrão de segregação 3:1 (indivíduos suscetíveis e resistentes) em todas as 87 famílias heterozigotas suscetíveis avaliadas. Observando-se a segregação dentro de cada família, verificou-se uma variação de duas a oito plantas resistentes (extremos de sete e oito plantas resistentes foram casos isolados dentro da segregação das famílias). No entanto, a grande maioria apresentou entre três a cinco plantas resistentes confirmando a segregação esperada de 3S : 1R (ou 12 plantas suscetíveis para quatro plantas resistentes) para casos de resistência recessiva monogênica. A completa classificação genotípica dos indivíduos (i.e. homozigotos e heterozigotos) foi empregada para testar a hipótese de segregação 1:2:1 (homozigoto resistente, heterozigoto suscetível e homozigoto suscetível). Os resultados apresentaram valores significativos no teste de qui-quadrado para o modelo de segregação 1:2:1. Nesse caso, a hipótese de segregação foi aceita.

A suscetibilidade da geração  $F_1$  e os resultados observados nas avaliações fenotípicas das famílias  $F_{2,3}$  após inoculação com o TYLCV-IL permitiu corroborar trabalhos prévios de análise de gerações utilizando outras progênies provenientes do mesmo cruzamento (Giordano *et al.* 2005b e García-Cano *et al.*, 2008), onde a resistência a begomovírus bipartidos e monopartidos foi determinada como recessiva monogênica. Os resultados aqui obtidos não indicaram entretanto efeitos de genes epistáticos, como sugerido anteriormente por García-Cano *et al.* (2008).

Vários estudos de herança reportados com combinações distintas de begomovírus e espécies de *Solanum* indicam que o controle de resistência é dependente da combinação do acesso de germoplasma e da espécie viral (Morales, 2001).

Linhas resistentes provenientes do híbrido ‘Tyking’, cujo background genético não é plenamente conhecido (Laterrot, 1995), foram descritas. A linha ‘FLA-653’ por exemplo é derivada de cruzamentos envolvendo ‘Tyking’ e *S. chilense* (‘LA-2779’) e apresenta resistência condicionada por um gene recessivo nomeado de *tgr-1* (Bian *et al.*, 2007). Bian *et al.* (2007) observaram uma menor quantidade de DNA viral em folhas de ‘FLA-653’ inoculadas localmente, quando comparado à cultivar suscetível. A longas distâncias observou-se impedimento da translocação viral, tal como ocorre com a resistência de ‘Tyking’ (Fargete *et al.*, 1996). A resistência recessiva monogênica identificada na linha ‘TX-468-RG’ (Giordano *et al.*, 2005b) é derivada também da autofecundação do híbrido ‘Tyking’. Por sua vez, a resistência conferida por ‘TX-468-RG’ manifesta-se como limitação da acumulação sistêmica viral e ausência de sintomas (García-Cano *et al.*, 2008). Neste contexto, a resistência presente em ‘Tyking’, descrita anteriormente como funcional a begomovírus (Laterrot, 1995) deve contribuir com a resistência presente em ‘FLA-653’. De acordo com Bian *et al.* (2007) a resistência presente em ‘TX-468-RG’ também deve estar presente em ‘FLA-653’. Como estas duas resistências apresentam padrões de expressão similares, são recessivas monogênicas e provêm do mesmo material genético (o híbrido ‘Tyking’), seria interessante futuramente realizar também testes de alelismo entre ‘TX-468-RG’ e ‘FLA-653’ para determinar se o mesmo determinante genético opera nestas linhas frente a estas espécies de *Begomovirus*.

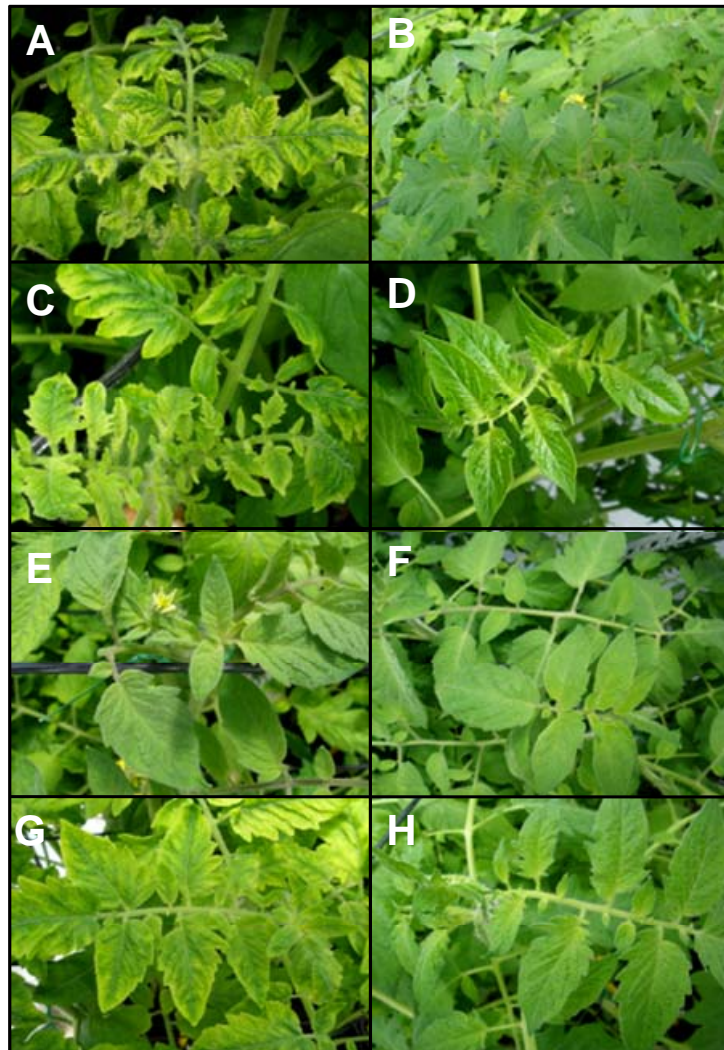
Quanto às famílias  $F_{2,3}$ , estudos posteriores serão realizados com o intuito de determinar se genes e/ou regiões genômicas que conferem resistência tanto a espécies de

*Begomovirus* monopartidos como bipartidos são idênticas ou distintas nesta linhagem. Para que isto seja possível, em uma segunda etapa deste trabalho, ensaios serão conduzidos com este mesmo conjunto de famílias  $F_{2:3}$  em condições de casa-de-vegetação na Embrapa-CNPQ no Brasil, utilizando uma espécie de begomovírus bipartido através da inoculação de clones infectivos.

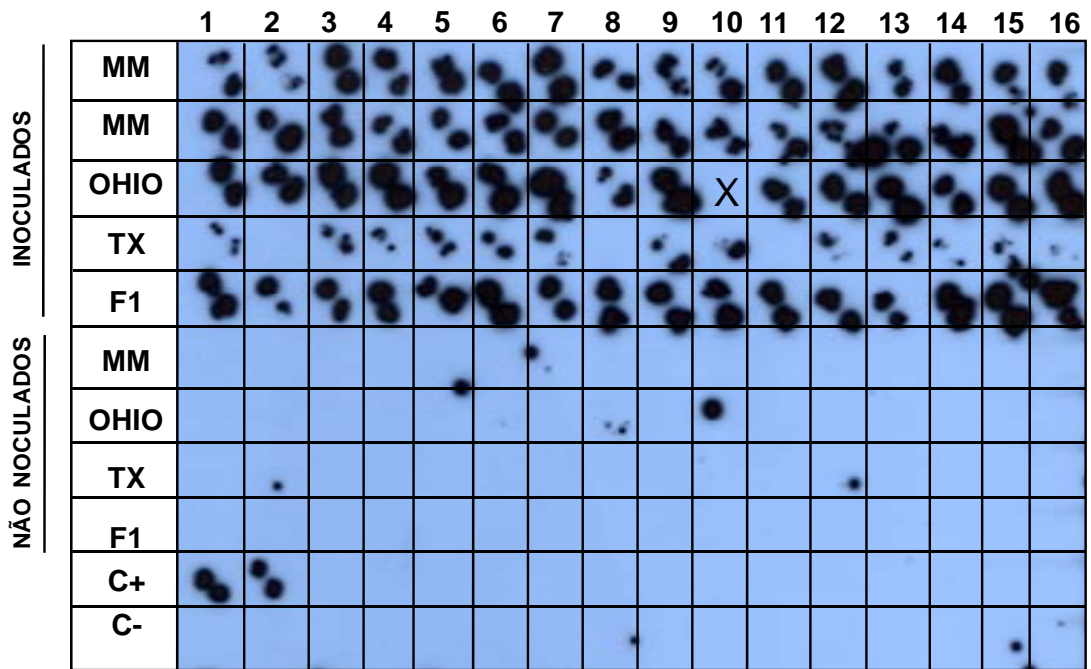
Os resultados obtidos com as famílias  $F_{2:3}$  reportado no presente trabalho permitiu classificar os genótipos de todos os indivíduos  $F_2$  que originaram estas famílias. Estes dados serão importantes em experimentos na busca de marcadores moleculares para resistência a monopartidos. O DNA de todos os indivíduos  $F_2$  que tiveram suas progênes avaliadas no presente ensaio foram extraídos e poderão ser utilizados em futuros experimentos. Os resultados das avaliações fenotípicas das famílias  $F_{2:3}$  frente ao TYLCV-IL, além de confirmarem uma herança monogênica recessiva, minimizando a possibilidade de efeitos de outros genes epistáticos, contribuirão para as próximas etapas deste trabalho.



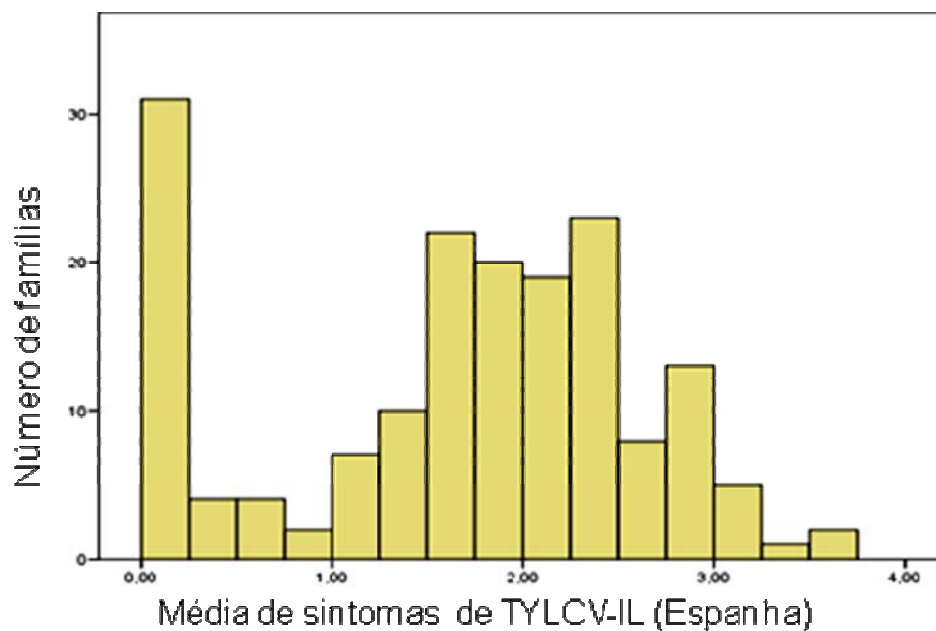
**Figura 1** - População de famílias  $F_{2:3}$  derivadas do cruzamento 'Ohio 8245' x 'TX-468-RG' utilizadas na avaliação para padrões de segregação da resistência a begomovírus **A** - Plantas em estágio de 3-4 folhas antes da inoculação e **B** - Inoculação de um clone infectivo de *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) mediante *Agrobacterium tumefaciens*.



**Figura 2** - Expressão fenotípica de genótipos de tomate frente à inoculação com clone infectivo de *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL) via agroinoculação. Da parte superior para a inferior: 'Moneymaker'- controle positivo (**A** - inoculado e **B** - não inoculado); 'Ohio 8245'-parental suscetível (**C** - inoculado e **D** - não inoculado); 'TX-468-RG'-parental resistente (**E** - inoculado e **F** - não inoculado) e população F<sub>1</sub> (derivada do cruzamento 'Ohio 8245' x 'TX-468-RG') (**G** - inoculado e **H** - não inoculado).



**Figura 3** - Acumulação viral em tecidos de plantas de tomate inoculadas com clone infectivo de *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) via agroinoculação e detecção via hibridização com sonda molecular específica marcada com digoxigenina. Painel superior corresponde às plantas inoculadas, e painel inferior às plantas não inoculadas onde: MM = ‘Moneymaker’ (controle suscetível); OHIO = ‘Ohio 8245’ (parental suscetível); TX = ‘TX-468-RG’ (parental resistente) e F1 = população proveniente do cruzamento de ‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’. Avaliação realizada aos 25 dias após inoculação. Os números na parte superior indicam o número das plantas avaliadas e X = planta morta.



**Figura 4** - Distribuição de famílias  $F_{2,3}$  avaliadas via severidade de sintomas. As famílias foram provenientes do cruzamento de ‘Ohio 8245’ (parental suscetível)  $\times$  ‘TX-468-RG’ (parental resistente) e inoculadas com o begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL) mediante clone viral infeccioso via *Agrobacterium tumefaciens*.

**Tabela 1** - Distribuição e fenotipagem de famílias F<sub>2:3</sub> resistentes, suscetíveis e segregantes provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* ‘Ohio 8245’(suscetível) x ‘TX-468-RG’ (resistente) frente ao begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus*- Israel (TYLCV-IL).

| Fenótipo*/Genótipo            | Famílias de F3 (F2:3)  | Famílias |
|-------------------------------|--|----------|
| Resistente<br>(homozigotas)   | 2, 4,8, 11, 18,32, 43, 45, 51, 52, 53, 69, 72, 77, 80, 82, 94, 98,102,109,112, 115, 117, 118, 122, 140, 143, 153, 154, 155, 156, 162, 163, 167, 173, 175, 178, 180, 181, 193, 198  | 41       |
| Suscetível<br>(homozigotas)   | 3, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 21, 26, 28, 34, 35, 36, 40, 42, 44, 49, 71, 73, 78, 85, 103, 104, 107, 111, 119, 129, 130, 135, 136, 144, 147, 148, 164, 165, 177, 182, 183, 185, 186, 190, 194, 196   | 43       |
| Suscetível<br>(heterozigotas) | 5, 10, 15, 16, 22, 23, 24, 25, 29, 31, 33, 37, 38, 39, 41, 46, 48, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 75, 76, 79, 81, 83, 84, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 95, 100, 101, 105, 108, 113, 114, 116, 120, 123, 124, 126, 128, 131, 132, 133, 134, 137, 138, 139, 141, 145, 149, 151, 152, 157, 158, 159, 160, 161, 166, 169, 170, 171, 172, 174, 176, 184, 187, 188, 189, 191, 192, 195, 197, 199 | 87       |

\* Famílias fenotipadas com base em escala de notas variando de 0-5, onde: 0 = ausência de sintomas, 1 = sintomas incipientes; 2 = encarquilhamento das margens dos folíolos das folhas superiores; 3 = encarquilhamento dos folíolos das folhas superiores e intermediárias e amarelecimento; 4 = encarquilhamento dos folíolos das folhas ao longo de toda a planta, amarelecimento e atraso no crescimento e 5 = encarquilhamento dos folíolos de todas as folhas da planta, redução da lâmina foliar, amarelecimento e paralisação do crescimento da planta.

## CAPÍTULO 7

**Identificação de marcadores RAPD ('Randomly Amplified Polymorphic DNA') associados com a resistência de 'TX-468-RG' (gene *tcm-1*) ao begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV).**



## RESUMO

No tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), o sistema de marcadores RAPD ('Randomly Amplified Polymorphic DNA') tem sido empregado na construção de diversos mapas globais e locais no genoma e tem sido amplamente utilizado em muitas plataformas de melhoramento assistido por marcadores (MAS), incluindo o processo de monitoramento de diversas regiões genômicas contendo determinantes genéticos de resistência a doenças. Diversos genes de resistência a espécies de *Begomovirus* em *Solanum* (seção *Lycopersicon*) têm sido identificados e mapeados, incluindo o 'locus' *Ty-1* mapeado no cromossomo 6 de tomate e o 'locus' *Ty-2* no cromossomo 11. Outro gene de resistência recentemente caracterizado é o *tcm-1*, que está presente em algumas linhagens derivadas do híbrido 'Tyking'. Este gene recessivo apresenta um amplo espectro de ação, capaz de conferir resistência tanto aos begomovírus bipartidos presentes no Brasil quanto às principais espécies de *Begomovirus* monopartidos que formam o 'complexo denominado Tomato yellow leaf curl disease'. No entanto, até o presente momento, não foram desenvolvidos trabalhos visando identificar marcadores moleculares para o 'locus' *tcm-1*. O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores do tipo RAPD associados ao 'locus' *tcm-1*. Foram avaliados inicialmente 520 'primers' RAPD em busca de polimorfismos entre 'TX-468-RG' (resistente a begomovírus, devido ao 'locus' *tcm-1*) e 'Ohio 8245' (suscetível). Esta análise resultou na seleção de 18 'primers' que foram re-avaliados para análises de associação com resistência/suscetibilidade a *Begomovirus* na população segregante de 149 indivíduos F<sub>2</sub> derivados do cruzamento 'Ohio 8245' x 'TX-468-RG'. No total, sete marcadores RAPD foram identificados ligados em associação e em repulsão com a região genômica contendo o gene/'locus' *tcm-1*. Os programas de melhoramento estão adotando a estratégia de piramidizar genes de resistência a begomovírus visando melhorar a expressão e a aumentar durabilidade da resistência. Esta estratégia requer o uso de marcadores moleculares em sistemas de seleção assistida para monitorar a incorporação de diferentes 'loci' (dominantes e recessivos) que conferem fenótipo idêntico de resistência a espécies de *Begomovirus*. Neste contexto, os marcadores RAPD aqui descritos poderão ser ferramentas importantes dentro de sistemas de seleção assistida visando incorporar o 'locus' *tcm-1* em linhagens elite de tomateiro.

**Palavras-chaves:** *Begomovirus*, resistência, marcadores, RAPD, seleção assistida.

## INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares constituem regiões do genoma passíveis de serem detectadas via métodos analíticos apropriados e cuja presença (ou ausência) pode caracterizar ou assinalar uma sequência associada com alguma função de interesse para estudos genéticos ou para o melhoramento vegetal (Gotmisky *et al.*, 1999). Vários sistemas de marcadores moleculares têm sido utilizados na caracterização e discriminação genotípica e identificação de marcadores ligados às características desejáveis em plantas (Ferreira & Grattaplagia, 1996). Para o melhoramento vegetal, o uso de marcadores, permite acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejados, reduzindo o tempo necessário para completar uma geração e conseqüentemente aumentando a eficiência de todo o processo (Ferreira & Grattaplagia, 1996).

Os sistemas de marcadores RAPD ('Randomly Amplified Polymorphic DNA') (Williams *et al.*, 1990), AP-PCR ('Arbitrarily Polymerase Chain Reaction') (Welsh & McClelland, 1990) e DAF ('DNA Amplification Fingerprinting') (Caetano-Anóles *et al.*, 1991) fazem parte da primeira geração de marcadores obtidos via utilização de estratégias mais simples via PCR. Todos estes sistemas são baseados na utilização de 'primers' mais curtos (5-10 bp) e de sequências arbitrárias, capazes de anelar (ao acaso) em diferentes regiões a distâncias que permitem a obtenção de amplicons, de tamanhos entre 50 e 2000 bp (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990 e Caetano-Anóles *et al.*, 1991). O sistema RAPD utiliza 'primers' decâmeros e tornou-se uma ferramenta de grande utilização em estudos genéticos, propiciando grandes avanços na área de marcadores pois promove ampla cobertura genômica, aumentando as chances de identificar polimorfismos em regiões próximas de genes de interesse. Tipicamente usa-se apenas um tipo de 'primer' em cada reação. Desta forma, a reação de RAPD ocorre devido ao anelamento do 'primer' em pontos próximos do genoma, delimitando a região que será amplificada (Welsh & McClelland, 1990 e Williams *et al.*, 1990).

No tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e em diversas espécies do gênero *Solanum* (Seção *Lycopersicon*), o sistema de marcadores RAPD tem sido empregado na construção de diversos mapas globais e locais no genoma e tem sido amplamente utilizado em muitas plataformas de melhoramento assistido por marcadores (MAS), incluindo o processo de

monitoramento de diversos ‘loci’ contendo determinantes genéticos de resistência a doenças (Van-der-Beek *et al.*, 1994; Ganai *et al.*, 1995; Stevens *et al.*, 1995; Yaghoobi *et al.*, 1995; Pillen *et al.*, 1996; Chague *et al.*, 1996; 1997; Doganlar *et al.*, 1998 e Kang *et al.*, 2002).

As ‘begomoviroses’ são consideradas as principais doenças do tomateiro no mundo (Brown *et al.*, 1995) e são responsáveis por severas perdas na produção (Giordano *et al.*, 2005a). Espécies de *Begomovirus* podem apresentar dois componentes genômicos (bipartidas) ou apenas um componente genômico (monopartidas). Entre as espécies de genoma monopartido destacam-se as aquelas associadas ao ‘complexo viral Tomato yellow leaf curl disease’ (TYLCD), amplamente distribuídas por vários países da África, Europa, América do Norte, Central e Sul, Ásia (Moriones & Navas-Castillo 2000; Fauquet & Stanley, 2005; Abhary *et al.*, 2007 e Rojas *et al.*, 2007), mas ainda não detectadas no Brasil. As espécies de *Begomovirus* são transmitidas na natureza pela mosca-branca *Bemisia tabaci* Genn. biótipo B, inseto de hábito alimentar polígrafo e bem adaptado a diversas condições ambientais. O controle químico de *B. tabaci* é oneroso e tem propiciado ao desenvolvimento de populações resistentes a inseticidas (Horowitz & Ishaaya, 1995).

O emprego de cultivares resistentes ao vírus e/ou ao vetor representa a principal estratégia de controle. Para isto, programas de melhoramento têm se baseado na busca de fontes de resistência a begomovírus, principalmente, em espécies selvagens de tomate. O controle eficiente de doenças importantes do tomateiro tem sido alcançado via utilização de cultivares com genes de resistência. Estas cultivares foram obtidas por meio de trabalho sistemático de melhoramento genético envolvendo cruzamentos interespecíficos para introgressão destes genes a partir de espécies silvestres do gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*). As fontes de resistência mais promissoras para espécies de *Begomovirus* têm sido identificadas nas espécies *S. chilense*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum* e *S. habrochaites*. Os programas de melhoramento estão adotando a estratégia de piramidizar genes de resistência a begomovírus visando melhorar a expressão e aumentar a durabilidade do fenótipo. Neste contexto, o uso de marcadores moleculares constitui importante ferramenta para o melhoramento genético, ao propiciar a seleção assistida da introgressão simultânea de diferentes genes de interesse controlando um mesmo caráter.

Trabalhos visando o desenvolvimento de marcadores moleculares para monitorar a introgressão/incorporação de genes/‘loci’ de resistência a begomovírus em tomateiro já estão

em andamento. O gene *Ty-1* de *S. chilense*, que apresenta dominância parcial e ampla resistência a espécies de *Begomovirus*; já foi mapeado usando marcadores RFLP ('Restriction Fragment Length Polymorphism') no cromossomo 6 em ligação estreita com o gene *Mi* que controla resistência a espécies de *Meloidogyne* (Zamir *et al.*, 1994). Marcadores do tipo microssatélites ligados ao gene *Mi*, portanto, próximo a *Ty-1*, também têm sido identificados e utilizados em sistemas de seleção assistida (Zamir *et al.*, 1994; Nízio *et al.*, 2008 e SGN, 2008,).

Outro 'locus'/gene de resistência é *Ty-2*, resultado da introgressão no tomateiro cultivado a partir de um acesso da espécie *S. habrochaites*. Este gene tem conferido bons níveis de resistência contra isolados asiáticos de begomovírus (Hanson *et al.*, 2000 e Lapidot & Friedmann, 2002). De acordo com Hanson *et al.* (2000), genes de resistência a begomovírus localizam-se na região de introgressão de *S. habrochaites* que está associada com a presença de alelos do marcador RFLP TG36. Sendo assim, estes autores propõem o uso de *Ty-2* para referir-se ao gene de resistência a begomovírus no cromossomo 11, próximo à região do marcador TG36.

O gene *Ty-3* é parcialmente dominante e confere elevados níveis de resistência a isolados de TYLCV e *Tomato mottle virus* (Ji & Scott, 2006). Este gene é derivado de cruzamentos entre acessos de tomateiro cultivado e o acesso da espécie *S. chilense* 'LA-2779' (Ji & Scott, 2006). Marcadores do tipo SCAR foram desenvolvidos e o gene *Ty-3* pode ser monitorado mediante o uso dos marcadores 'FLUW25' ou 'FER-G8', dependendo da origem da introgressão (Ji & Scott, 2006).

Recentemente, um novo gene recessivo (denominado *tgr-1*) foi caracterizado na linhagem 'FLA-653'. Esta linhagem é derivada de cruzamentos envolvendo o acesso *S. chilense* 'LA-2779' e o híbrido 'Tyking' (Bian *et al.*, 2007). De acordo com Bian *et al.* (2007), 'Tyking', cuja origem genética é desconhecida, deve ser a provável fonte do gene que confere resistência a begomovírus na linhagem 'FLA-653'. Por enquanto, não existem relatos de trabalhos visando ao desenvolvimento de marcadores moleculares associados com o 'locus' *tgr-1*.

Outro gene de resistência, recentemente caracterizado, é derivado diretamente do híbrido 'Tyking' (Giordano *et al.*, 2005b). Este gene recessivo denominado *tcm-1* está presente em germoplasmas derivado da linhagem 'TX-468-RG', sendo descrito como fonte

de amplo espectro capaz de conferir resistência tanto aos begomovírus bipartidos presentes no Brasil (Giordano *et al.*, 2005b) quanto às principais espécies de *Begomovirus* monopartidas que formam o ‘complexo viral TYLCD’ (García-Cano *et al.*, 2008). No entanto, até o presente, não foram desenvolvidos trabalhos visando identificar marcadores moleculares para monitorar ao ‘locus’ *tcm-1* em programas de seleção assistida.

Neste contexto, visando dar suporte a programas de melhoramento genético, o presente trabalho teve como objetivo identificar marcadores do tipo RAPD associado com a resistência a espécies de *Begomovirus* (‘locus’ *tcm-1*) presente na linhagem *S. lycopersicum* ‘TX-468-RG’ (Giordano *et al.*, 2005b). Para tal, foram avaliados, um conjunto de 520 ‘primers’ RAPD em busca de polimorfismos entre ‘TX-468-RG’ e ‘Ohio 8245’, contrastantes para resistência a begomovírus. O objetivo a longo prazo é desenvolver uma plataforma de seleção assistida para monitorar a incorporação da resistência derivada de ‘TX-468-RG’ em linhagens elite de tomateiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material genético e extração de DNA** - O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Melhoramento Genético de Hortaliças e de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças, sediado em Brasília, DF. Inicialmente a busca por polimorfismos foi limitada a dois acessos de *S. lycopersicum* contrastantes para a característica de resistência a patógenos: ‘Ohio 8245’ (uma cultivar de tomate para processamento, suscetível a begomovírus) e a linhagem ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus). As amostras foliares foram coletadas de plantas saudáveis mantidas em casa-de-vegetação. O DNA total foi extraído de folhas jovens de plantas segundo a metodologia de purificação usando CTAB com pequenas modificações (Boiteux *et al.*, 1999). As quantificações do DNA foram feitas por comparação visual com amostras de concentração conhecida de DNA do fago (20 a 400ng) após separação por eletroforese em gel de agarose (1%) e coloração (durante 15 minutos) com brometo de etídeo (10mg/mL) diluído em tampão TAE 1X.

**Sistema de marcadores RAPD** - Um total de 520 RAPD ‘primers’ (série Operon OP-A1 a OP-Z20, Operon Technologies, Alameda - Califórnia, EUA) foi testado na tentativa de

encontrar polimorfismos entre os parentais ‘Ohio 8245’ e ‘TX-468-RG’. As amostras de DNA quantificadas foram diluídas para a concentração de 5 ng/μL e utilizadas nas reações de RAPD. Todas as reações foram feitas no volume total de 12,5 μL contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM, 200 μM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1,6 μM do ‘primer’, uma unidade da enzima Taq polimerase e 15-20 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 programado para 40 ciclos, sendo cada um constituído pelos parâmetros a seguir: 30 segundos a 94° C, 60 segundos a 36° C (RAMP de 70%) e 90 segundos a 72°C, seguido de uma extensão final de 10 minutos a 68° C e finalmente, a temperatura foi a 4° C. A cada amostra foram adicionados 2 μL de azul de bromofenol + glicerol. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,4% a 1,7%, já contendo brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM e EDTA 1mM) ou TBE (Tris-Borato 45mM e 1mM EDTA), a 125V, por um período de, aproximadamente, 3 h. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

### **Seleção de marcadores potencialmente associados com resistência a begomovírus**

DNA genômico foi extraído de 149 indivíduos F<sub>2</sub> provenientes do cruzamento de ‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’ que foram fenotipados quanto à resistência a begomovírus com base em uma escala de notas, variando de 1 a 4, onde 1 = ausência de sintomas; 2-4 = gradação de sintomas. Plantas com nota 1 foram consideradas como resistentes e plantas com notas entre 2 e 4 foram classificadas como suscetíveis (Tabela 1). O DNA dos acessos contrastantes bem como o DNA extraído de onze indivíduos com nota 1 e onze indivíduos F<sub>2</sub> com nota 4, foram, inicialmente, avaliados para identificar os marcadores RAPD potencialmente associados com resistência a begomovírus. Marcadores que indicaram associação com o ‘locus’ *tcm-1* foram então avaliados utilizando amostras da população F<sub>2</sub>. As reações de amplificação foram feitas no volume total de 12,5 μL utilizando DNA na concentração de 5 ng/μL. As amplificações foram efetuadas em termociclador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 programado conforme mencionado anteriormente.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**Análise com o sistema de marcadores RAPD** - Os acessos ‘Ohio 8245’ e ‘TX-468-RG’ foram selecionados para uma triagem inicial com 520 ‘primers’ RAPD. Os resultados indicaram que a técnica RAPD apresentou relativa eficácia em revelar polimorfismos estáveis (com perfil de qualidade e reprodutibilidade) entre os dois acessos de tomateiro. Esta coleção de ‘primers’ permitiu a anotação de mais de 1200 amplicons. Oitenta e três ‘primers’ capazes de identificar polimorfismos entre os parentais foram reavaliados e 13 não confirmaram os polimorfismos (Figura 1A). Os 70 ‘primers’ restantes geraram 102 polimorfismos (52 amplicons presentes em ‘TX-468-RG’ e 50 amplicons presentes apenas em ‘Ohio 8245’). Estes ‘primers’ foram re-avaliados em um grupo de indivíduos contrastantes dentro da população F<sub>2</sub> segregante obtida do cruzamento ‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’. Nesta estratégia, as análises foram conduzidas com DNA extraído do parental suscetível (‘Ohio 8245’), do parental resistente (‘TX-468-RG’) e de 11 indivíduos fenotipados como suscetíveis (com nota 4: 001, 005, 024, 031, 040, 045, 054, 064, 066, 071 e 081) e 11 fenotipados como resistentes (com nota 1: 013, 037, 063, 069, 070, 078, 084, 094, 108, 135 e 137) (Tabela 1). O objetivo desta análise foi identificar um subconjunto de ‘primers’ capazes de produzir amplicons polimórficos e potencialmente associados/ligados à região genômica contendo o gene *tcm-1*. Esta análise resultou na seleção de 18 ‘primers’ (Tabela 2) que foram re-avaliados em reações subsequentes para verificar a associação com resistência/suscetibilidade a begomovírus na população. Foram encontrados marcadores promissores, aparentemente apresentando tanto associação como repulsão na região genômica contendo o gene/locus *tcm-1* (Figuras 2-5). A frequência de associação de marcadores a classes fenotípicas encontra-se listada na Tabela 2.

Os marcadores moleculares ligados a um caráter desejado podem estar localizados próximos do gene/região genômica controlando a característica procurada ou fazerem parte do próprio ‘locus’ de interesse. As frequências de recombinação refletem a probabilidade de permutas genéticas, ou seja, a porcentagem de vezes em que podem ocorrer recombinação entre o ‘locus’ de interesse e o segmento cromossômico onde se situa o marcador selecionado. Quanto mais frequente a presença do marcador e a presença do fenótipo de interesse, menor será a frequência de recombinação entre estes e, conseqüentemente, mais vezes o marcador molecular e o gene de interesse estarão em um mesmo gameta.

Dos 83 ‘primers’, 24 deram origem a amplicons, potencialmente associados à resistência ou suscetibilidade nesta amostra da população F<sub>2</sub> e foram testados com a população segregante. Nessa análise observou-se que 18 ‘primers’ continuaram gerando amplicons associados à resistência ou suscetibilidade entre os indivíduos. Esses polimorfismos do tipo presença ou ausência de bandas específicas amplificadas através da técnica RAPD geram marcadores do tipo dominante, não sendo possível discernir se os ‘loci’ observados são heterozigotos ou não. A grande maioria dos ‘primers’ que identificaram polimorfismo entre os parentais não mantiveram o polimorfismo entre os indivíduos das populações segregantes testadas, como no caso de OP-X6 ilustrado na Figura 1. Observa-se a presença de um amplicon em ‘TX-468-RG’ com tamanho aproximado de 500 pb, presente também nos demais indivíduos resistentes da população analisada e em grande parte dos indivíduos suscetíveis. De modo geral, o maior número de polimorfismos observados foi no parental suscetível (‘Ohio 8245’). Os amplicons gerados pelos ‘primers’ OP-R4 e OP-M18 (de tamanho de 950 e 1000 pb) são representantes do grupo de marcadores em repulsão (Figura 1 B e C). Foram observados, em menor número, amplicons polimórficos originários do parental resistente (‘TX-468-RG’). Um exemplo deste grupo é o amplicon produzido pelo ‘primer’ OP-G16 (Figura 2 A). Polimorfismo de intensidade também foi observado no perfil de amplicons produzidos pelo ‘primer’ OP-T18 (Figura 2 B). De acordo com Bardakci (2001) a razão para amplificação de DNA com intensidades diferentes em não é bem conhecida. Dependendo das condições variáveis das reações de RAPD, existe a possibilidade dos ‘primers’ avaliados não se anelarem perfeitamente ao DNA molde em todos os ciclos da PCR, amplificando eficientemente apenas em alguns ciclos. Devido a esse fato, os fragmentos amplificados podem apresentar intensidades diferenciadas. Estes marcadores são de difícil análise, podendo levar a erros de interpretação dependendo das condições da reação. Uma maneira de estabilizar estes polimorfismos é a purificação e sequenciamento dos amplicons com estas características. A identificação do segmento genômico amplificado poderá permitir a síntese de ‘primers’ que intensifiquem o polimorfismo ou mesmo que o convertam em um marcador codominante, em uma estratégia semelhante a do sistema de marcadores SCAR (Paran & Michelmore, 1993).

No desenvolvimento de marcadores baseados no sistema RAPD, a reprodução dos resultados de amplificação tem sido apontada como a principal desvantagem do método.



Vários trabalhos têm reportado que técnicas de marcadores de DNA têm sido testadas, principalmente, visando demonstrar a reprodutibilidade dos marcadores desenvolvidos. Na maioria das vezes, a reprodutibilidade tem envolvido testes dentro do mesmo laboratório, embora experimentos testando a habilidade de diferentes laboratórios em reproduzir a identidade da técnica de RAPD também têm sido descritos (Penner *et al.*, 1993). Estudos sobre o efeito de determinantes genéticos que influenciam os padrões de RAPD têm sido realizados por diversos grupos (Meunier & Grimont, 1993) e todos destacam a importância da *Taq* polimerase e do termociclador na otimização das reações de amplificação via RAPD (Yu & Paul, 1992). Os resultados de Rajput *et al.* (2005) demonstram a dificuldade de reprodução dos resultados obtidos em diversos laboratórios utilizando essa técnica (Penner *et al.*, 1993), e embora, RAPD seja considerada não dependente da concentração de DNA, diferenças podem ocorrer quando estas concentrações são excessivamente diluídas (Vos *et al.*, 1995).

Apesar da suas limitações intrínsecas, o sistema de marcadores RAPD tem sido extremamente útil na genética e no melhoramento do tomateiro. A técnica RAPD tem sido amplamente empregada na construção de mapas genéticos (Foolad *et al.*, 1993), na caracterização na avaliação de acessos em bancos de germoplasma (Gonçalves *et al.*, 2008), no controle da pureza de híbridos (Rom *et al.*, 1995 e Singh *et al.*, 2007) e na busca de marcadores associados à resistência (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991; Vander-Beek *et al.*, 1994; Ohmori *et al.* 1995; Stevens *et al.*, 1995; Yaghoobi *et al.*, 1995; Pillen *et al.*, 1996; Chague *et al.*, 1996; 1997; Doganlar *et al.*, 1998 e Kang *et al.*, 2002).

No presente trabalho foi possível identificar a existência de polimorfismos entre as linhagens contrastantes ‘Ohio 8245’ (suscetível a begomovírus) e ‘TX-468-RG’ (linhagem resistente devido à presença do gene/locus *tcm-1*) para vários ‘primers’ avaliados. Alguns amplicons mostraram-se extremamente estáveis e com reprodutibilidade em alta nos indivíduos da geração F<sub>2</sub> provenientes do cruzamento ‘Ohio 8245’ x ‘TX-468-RG’. As classes de polimorfismos observadas foram do tipo dominante (presença ou ausência do amplicon) e também polimorfismo de intensidade. O padrão de segregação de alguns marcadores indica claramente que, embora polimórficos entre os parentais, estes não estão ou estão fracamente ligados ao ‘locus’ *tcm-1* (exemplo OP-F19). No entanto, foram identificados pelo menos sete amplicons polimórficos tanto em associação quanto em

repulsão com o 'locus' *tcm-1*. Os dois tipos de polimorfismo são de interesse em sistema de seleção assistida, especialmente no caso de genes recessivos, em que a presença de um amplicon polimórfico em repulsão significa que o DNA foi extraído de um indivíduo homocigoto ou heterocigoto suscetível. O padrão de segregação (ainda parcial) indica maior proximidade deste conjunto de amplicons com a região genômica contendo o 'locus' *tcm-1*. A finalização da fenotipagem com todos os 149 indivíduos indicará quais 'primers'/amplicons possuem maior potencial (i.e. mais próximos e estáveis) para emprego em seleção indireta.

A informação de sequências destes amplicons RAPD poderá ser utilizada na síntese de 'primers' para convertê-los em marcadores do tipo SCAR (Paran & Michelmore, 1993), que são mais estáveis e podem potencialmente ser convertidos em marcadores co-dominantes.

**Tabela 1** - Distribuição e fenotipagem de indivíduos F<sub>2</sub>, provenientes do cruzamento de *Solanum lycopersicum* ‘Ohio 8245’ (susceptível a begomovírus) x ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus, devido ao gene *tcm-1*) com base em índice de severidade para infecção pelo begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV).

| Índice de Severidade* | Indivíduos de F <sub>2</sub>   | Fenótipo / Número de plantas |
|-----------------------|--|------------------------------|
| 1                     | 004, 006, 011, 012, 013, 014, 016, 017, 018, 019, 023, 027, 034, 036, 037, 041, 060, 063, 069, 070, 074, 078, 080, 083, 084, 087, 094, 104, 105, 108, 115, 120, 121, 125, 126, 131, 135, 137.  | Resistente (38)              |
| 2                     | 009, 022, 028, 032, 049, 062, 067, 072, 076, 082, 086, 088, 089, 092, 098, 101, 112, 114, 119, 122, 127, 130, 138.   | Susceptível (23)             |
| 3                     | 002, 003, 007, 008, 010, 015, 020, 021, 025, 026, 029, 030, 033, 035, 038, 042, 043, 044, 046, 048, 052, 053, 056, 065, 068, 077, 079, 090, 091, 096, 109, 110, 123, 124, 129, 132, 133, 134, 139, 140, 148.                               | Susceptível (41)             |
| 4                     | 001, 005, 024, 031, 039, 040, 045, 047, 050, 051, 054, 055, 057, 058, 059, 061, 064, 066, 071, 073, 075, 081, 085, 093, 095, 097, 099, 100, 102, 103, 106, 107, 111, 113, 116, 117, 118, 128, 136, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 149. | Susceptível (47)             |
| Total                 |  | 149                          |

\* Índice de severidade: 1 = ausência de sintomas, 2 = amarelecimento e mosaico dos folíolos, 3 = mosaico, enrugamento dos folíolos, clorose internerval e epinastia e 4 = mosaico, enrugamento severo e nanismo.

**Tabela 2** - Frequência de associação de marcadores a fenótipos de resistência ou suscetibilidade de 149 indivíduos F<sub>2</sub> provenientes de um cruzamento entre *Solanum lycopersicum* ‘Ohio 8245’ (suscetível a begomovírus) x ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus, gene *tcm-1*).

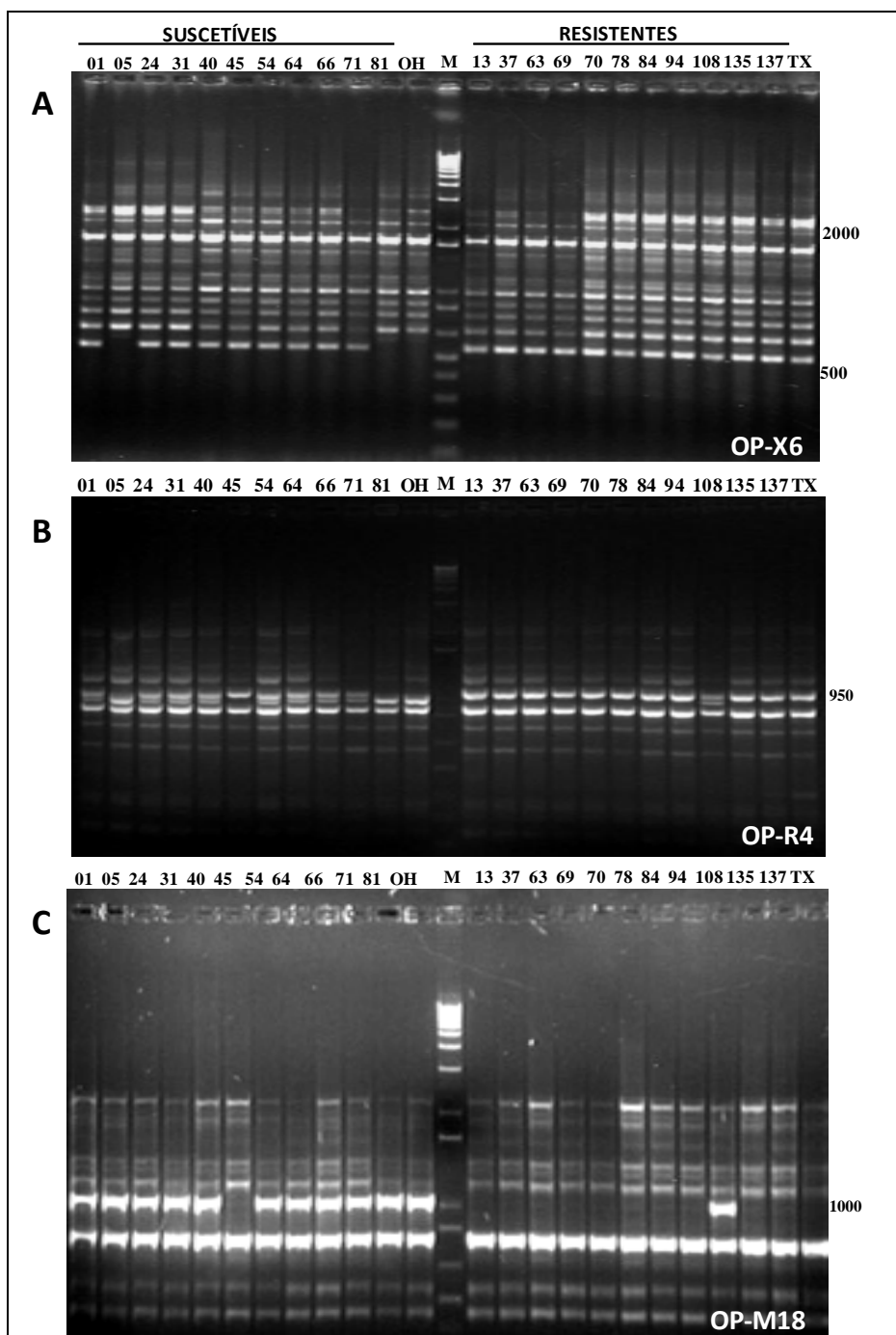
| ‘Primers’/pb | Origem Polimorfismo | Sequência do ‘Primers’ RAPD | Número de indivíduos por classe de sintomas** |             |        |        | Total de indivíduos F <sub>2</sub> avaliados |
|--------------|---------------------|-----------------------------|---|-------------|--------|--------|--|
|              |                     |                             | Resistentes <sup>1</sup>                      | Suscetíveis |        |        |  |
|              |                     |                             | 1 (38) <sup>a</sup>                           | 2 (23)      | 3 (41) | 4 (47) |  |
| A6 1200      | ‘Tx-468-RG’         | GGTCCCTGAC                  | 24/29 <sup>b</sup>                            | 18/23       | 13/36  | 05/42  | 130  |
| D11*750      | ‘Tx-468-RG’         | AGCGCCATTG                  | 23/31   | 16/23       | 13/33  | 06/37  | 124  |
| D19/650      | ‘Ohio 8245’         | CTGGGGACTT                  | 09/25   | 06/21       | 18/33  | 26/40  | 128  |
| F14/950      | ‘Ohio 8245’         | TGCTGCAGGT                  | 10/28   | 06/21       | 19/34  | 18/23  | 106  |
| F19/550      | ‘Ohio 8245’         | CCTCTAGACC                  | 23/33   | 06/21       | 19/33  | 25/42  | 129  |
| G16/480      | ‘Tx-468-RG’         | AGCGTCCTCC                  | 09/16   | 06/22       | 06/26  | 03/29  | 089  |
| J4*/500      | ‘Tx-468-RG’         | CCGAACACGG                  | 15/17   | 14/19       | 02/18  | 05/40  | 094  |
| K7/2000      | ‘Tx-468-RG’         | AGCGAGCAAG                  | 10/16   | 07/13       | 04/27  | 03/42  | 098  |
| L17*/450     | ‘Ohio 8245’         | GTGACAGGCT                  | 11/17   | 13/19       | 18/32  | 27/36  | 104  |
| M18/1050     | ‘Ohio 8245’         | CACCATCCGT                  | 10/32   | 08/22       | 17/26  | 28/41  | 121  |
| O20/700      | ‘Tx-468-RG’         | ACGTAGCGTC                  | 14/15   | 11/14       | 06/34  | 03/42  | 105  |
| P13/850      | ‘Ohio 8245’         | GGAGTGCCCTC                 | 06/23   | 07/11       | 18/29  | 27/39  | 102  |
| R4/1000      | ‘Ohio 8245’         | CCCGTAGCAC                  | 11/33   | 07/23       | 19/35  | 23/39  | 130  |
| T18*/800     | ‘Ohio 8245’         | GATGCCAGAC                  | 20/25   | 16/21       | 25/32  | 35/41  | 119  |
| V4/520       | ‘Ohio 8245’         | CCCCTCACGA                  | 07/31   | 05/08       | 18/34  | 18/19  | 092  |
| V7/1000      | ‘Ohio 8245’         | GAAGCCAGCC                  | 10/32   | 08/21       | 17/32  | 31/41  | 126  |
| W6/450       | ‘Ohio 8245’         | AGGCCCGATG                  | 11/34   | 06/22       | 18/36  | 28/44  | 136  |
| W6/550       | ‘Ohio 8245’         | AGGCCCGATG                  | 12/33   | 06/21       | 15/32  | 24/39  | 123  |
| Y11/650      | ‘Ohio 8245’         | AGACGATGGG                  | 10/31   | 05/17       | 18/32  | 25/37  | 117  |
| L14/500      | ‘Ohio 8245’         | GTGACAGGCT                  | 09/23   | 06/22       | 18/36  | 28/44  | 134  |

\*Polimorfismo de intensidade.

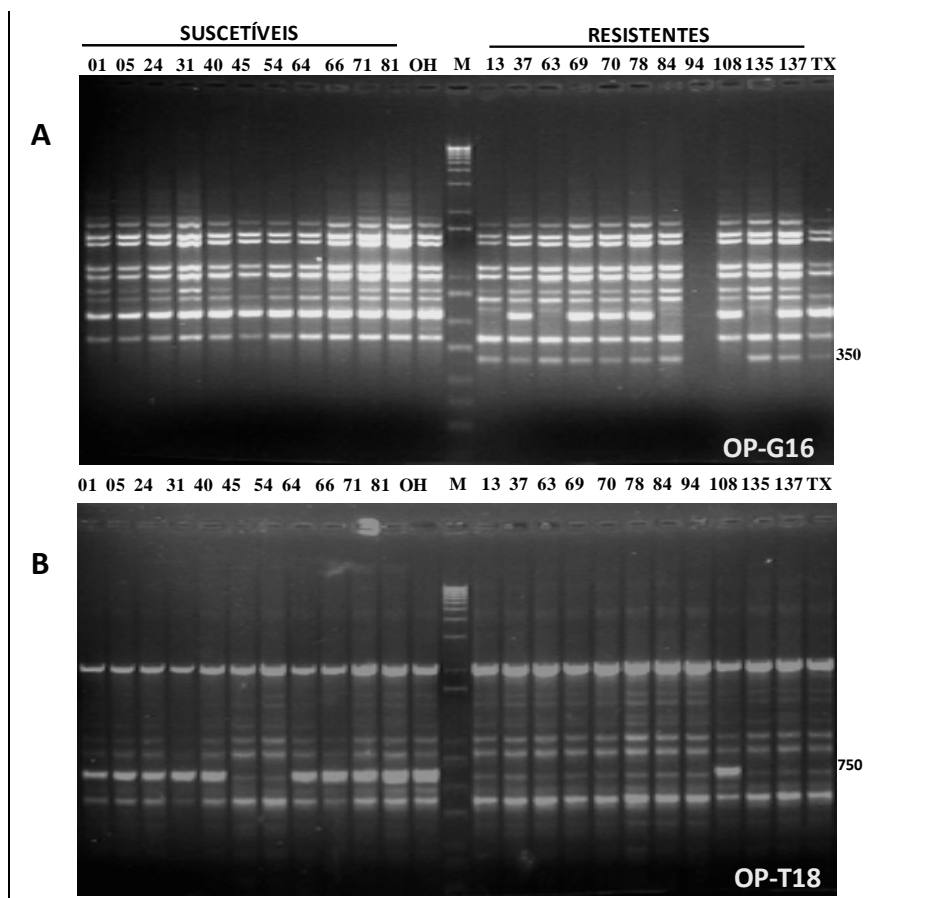
\*\* Índice de severidade: 1 = ausência de sintomas, 2 = amarelecimento e mosaico dos folíolos, 3 = mosaico, enrugamento dos folíolos, clorose internerval e epinastia e 4 = mosaico, enrugamento severo e nanismo

<sup>a</sup>Número entre parêntesis representa o número total de indivíduos por cada classe fenotípica na população de mapeamento de 149 indivíduos F<sub>2</sub>.

<sup>b</sup>Número de indivíduos com a presença do marcador / número de indivíduos analisados dentro de uma dada classe fenotípica.



**Figura 1** - Padrão de amplicons RAPD obtidos usando como molde amostras de DNA genômico ( $F_2$ ) de *Solanum lycopersicum* provenientes do cruzamento de ‘Ohio 8245’ (suscetível a begomovírus)  $\times$  ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus, gene *tcm-1*) e dos dois parentais. Colunas: 01 a 81: Indivíduos de  $F_2$  fenotipados como suscetíveis e OH: Parental suscetível. M: Marcador Molecular 1Kb DNA Plus Ladder. Colunas 13 a 137: Indivíduos de  $F_2$  fenotipados como resistentes e TX: Parental resistente. Marcadores OP-X6 em (A), OP-R4 em (B) e OP-M18 em (C).



**Figura 1** - Padrão de amplicons RAPD obtidos usando como molde amostras de DNA genômico (F<sub>2</sub>) de *Solanum lycopersicum* provenientes do cruzamento de ‘Ohio 8245’ (suscetível a begomovírus) x ‘TX-468-RG’ (resistente a begomovírus, gene *tcm-1*) e dos dois parentais. Colunas: 01 a 81: Indivíduos de F<sub>2</sub> fenotipados como suscetíveis e OH: Parental suscetível. M: Marcador Molecular 1Kb DNA Plus Ladder. Colunas 13 a 137: Indivíduos de F<sub>2</sub> fenotipados como resistentes e TX: Parental resistente. Marcadores OP-G16 em (A), OP-T18 em (B).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao técnico Antônio Francisco da Costa e ao técnico William Pereira Dutra (CNPq) pelo auxílio na implementação dos experimentos, coleta e análise dos dados dos capítulos 2 e 4 e também ao Emanuel Cunha de Oliveira pelo auxílio na manutenção e ensaios de nematóides. Os autores agradecem ainda o trabalho de campo conduzido com a ajuda dos funcionários da ‘Turma do Tomate’ do CNPH (Antônio Regis, Pamela, Claudemir, Ronan, Ari, Sebastião e Ronaldo) e também a Gonzalo e Miguel Ángel.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- 1- Os resultados da avaliação de diferentes híbridos inoculados em diferentes épocas com os vírus mostraram uma redução significativa de produtividade quando as mudas foram infectadas precocemente (antes do transplântio) comparado a mudas infectadas após transplântio, o que ressalta a importância epidemiológica de se retardar ao máximo o processo de infecção por begomovírus em tomateiro. Técnicas de manejo do sistema de produção, incluindo a opção preferencial pelo sistema de transplântio ao invés de semeadura direta a campo, bem como o isolamento físico de sementeiras, a escolha de idade das mudas para transplântio e a eliminação de fontes de inóculo no campo, são indicadas para reduzir os prejuízos econômicos causados por espécies de *Begomovirus*.
- 2- O híbrido 'HEI-036', desenvolvido para processamento industrial, mostrou-se promissor pela resistência genética a espécie viral *Tomato severe rugose virus* ToSRV e pelo elevado potencial produtivo. Além disso, os dados indicaram que o 'locus' *Ty-1* presente em heterozigose em 'HEI-036' é eficiente em condições epidêmicas, mas não impede reduções consideráveis de produtividade em condições de elevada pressão de inóculo. Entretanto, mesmo nestas condições, este híbrido foi capaz de destacar-se dos demais híbridos avaliados. Assim, o manejo criterioso das mudas para evitar infecções precoces por espécies de *Begomovirus* pode resultar em ganhos de produtividade.
- 3- Foi identificado um conjunto de 17 acessos do complexo *Solanum peruvianum* combinando alto nível de resistência à infecção mista por espécies de *Meloidogyne* (*M. incognita* e *M. javanica*) e ao begomovírus bipartido *Tomato rugose mosaic virus* ToRMV. Considerando-se que a resistência a begomovírus e espécies de *Meloidogyne* parecem estar ligadas em repulsão este conjunto de acessos, apresentando resistência simultânea aos dois grupos de patógenos,

constitui importante fonte de variabilidade para programas de melhoramento genético do tomateiro.

- 4- A avaliação de resistência para espécies de *Begomovirus* monopartidos confirmou, em parte, os resultados obtidos com ToRMV. A maioria dos acessos avaliados apresentou plantas assintomáticas aos 30 dias após inoculação, merecendo destaque os acessos de *S. peruvianum* ‘CNPH 0101’; ‘CNPH 1194’ e ‘CNPH 1445’, que combinaram resistência a begomovírus bipartidos, monopartidos e nematóides do gênero *Meloidogyne*. Esses resultados demonstraram que há uma diversidade de determinantes genéticos mediando a resistência a begomovírus bipartidos e monopartidos no gênero *Solanum* (Seção *Lycopersicon*). Esses acessos poderão ser empregados para promover a introgressão de novos genes de resistência via resgate de embriões após cruzamentos interespecíficos.
- 5- Fontes de resistência ao inseto vetor *Bemisia tabaci* biótipo B podem apresentar impactos significativos na redução da incidência e severidade da infecção por begomovírus. Dentre os acessos de *Solanum* avaliados quanto à resposta a uma população de mosca-branca, ‘LA 716’ (*S. pennellii*) apresentou os mais elevados níveis de resistência e uma baixa porcentagem de plantas sintomáticas para a infecção por begomovírus. A frequência reduzida de plantas sintomáticas em ‘LA 716’ pode estar associada com a presença de exsudatos produzidos por tricomas glandulares tipo IV impedindo a oviposição e a transmissão viral. Assim, a resistência ao vetor pode ser empregada como estratégia adicional e complementar ao manejo do complexo de begomovírus infectando tomateiro no Brasil. Estudos adicionais poderão ser realizados no intuito de ampliar a base genética da resistência à *B. tabaci* biótipo B, uma vez que mecanismos aparentemente distintos encontram-se presentes em *S. chilense*, *S. habrochaites* e *S. pennellii*.
- 6- A resistência da linhagem ‘TX-468-RG’ ao *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel (TYLCV-IL) manifestou-se na limitação da acumulação e translocação sistêmica viral. A acumulação viral em plantas resistentes foi aproximadamente oito vezes menor do que na cultivar suscetível ‘Moneymaker’, e propiciou uma redução da



dispersão primária e secundária de TYLCV-IL via transmissão pelo vetor *Bemisia tabaci* biótipo Q.

- 7- A incorporação do gene *tcm-1* em linhagens elite de tomateiro poderá ter impactos epidemiológicos positivos no manejo das espécies virais pertencentes ao ‘complexo viral TYLCD’. Este impacto epidemiológico também é esperado no manejo de begomovírus bipartidos empregando-se essa fonte de resistência, o que pode limitar a dispersão dos vírus em condições de campo.
- 8- A resistência recessiva monogênica presente em ‘TX-468-RG’ foi confirmada na geração F<sub>2:3</sub> proveniente de um cruzamento entre ‘Ohio 8245 e ‘TX-468-RG’ frente ao begomovírus monopartido TYLCV-IL. Estudos adicionais serão conduzidos com esta amostra de famílias F<sub>2:3</sub> frente a espécies de *Begomovirus* de genoma bipartido visando confirmar se a resistência às espécies brasileiras e a espécies monopartidas é controlada pelo mesmo gene recessivo (*tcm-1*) ou por outro(s) gene(s) em ligação estreita.
- 9- Foram identificados sete marcadores RAPD associados com a resistência a espécies de *Begomovirus* (‘locus’ *tcm-1*) presente na linhagem *S. lycopersicum* ‘TX-468-RG’. O padrão de segregação (ainda parcial) indica proximidade deste conjunto de amplicons com a região genômica contendo o ‘locus’ *tcm-1*. A informação de sequências destes amplicons RAPD poderá ser utilizada na síntese de ‘primers’ para convertê-los em marcadores do tipo SCAR, mais estáveis, visando, a longo prazo, desenvolver uma plataforma de seleção assistida para monitorar a incorporação da resistência derivada de ‘TX-468-RG’ em linhagens elite de tomateiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhary M, Pati BL, Fauquet CM (2007) Molecular biodiversity, taxonomy, and nomenclature of Tomato yellow leaf curl-like viruses. In: H.Czosnek (ed), *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*, Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 85 -118.
- Accotto GP, Navas-Castillo J, Noris E, Moriones E, Louro D (2000) Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *Journal of Plant Pathology* 106:179-186.
- Alba JM, Montserrat M, Fernández-Muñoz R (2009) Resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*) trichomes studied in a recombinant inbred line population. *Experimental and Applied Acarology* 47:35-47.
- Almeida JA, Galvão RM, Zerbini FM, Fontes EPB (1997a) A new geminivirus identified in the *Sida rhombifolia*-infecting geminivirus complex is probably monopartite. *Brazilian Journal of Genetics* 20:G38.
- Almeida JA, Galvão RM, Zerbini FM, Fontes EPB (1997b) Molecular characterization of novel tomato - and *Sida* infecting geminiviruses. *Brazilian Journal of Genetics* 20:G48.
- Almeida MTSCM, Decraemer W (2005) Trichodoridae, Família de nematóides vetores de vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 13:1-76.
- Al-Musa A (1982) Incidence, economic importance and control of *Tomato yellow leaf curl virus* in Jordan. *Plant Disease* 66:561-563.
- Alves AC, Lourenção AL, Melo AMT (2005) Resistência de genótipos de aboboreira a *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology* 34:973-979.
- Ambrozevícius LP, Calegário RF, Fontes EPB, Carvalho MG, Zerbini FM (2002) Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27:372-377.
- Ammati M, Thomason IJ, Roberts P (1985) Screening *Lycopersicon* spp. for new genes imparting resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Plant Disease* 69:112-115.
- Ammiraju JSS, Veremis JC, Huang X (2003) The heat-stable root-knot nematode resistance gene *Mi-9* from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. *Theoretical and Applied Genetics* 106:478-484.

- Andrade EC (2006) Análise de determinantes virais envolvidos na indução diferencial de sintomas por Begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. Tese de Doutorado. Viçosa-MG. Universidade de Viçosa. 95 p.
- Andrade EC, Ambrozevícius LP, Calegário RF, Fontes EPB, Zerbini FM (2002) Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research* 7:153-155.
- Aragão CA, Dantas BF, Benites FRG (2000) Tricomas foliares em tomateiro com teores contrastantes do aleloquímico 2-tridecanona. *Scientia Agricola* 57:813-816.
- Aragão FAS, Ribeiro CSC, Casali VWD, Giordano LB (2002) Cultivo de embriões de tomate *in vitro* visando a introgressão de genes de *Lycopersicon peruvianum* em *L. esculentum*. *Horticultura Brasileira* 20:605-610.
- Ascencio-Ibanez JT, Diaz-Plaza R, Mendez-Lozano J, Monslave-Fonnerga ZI, Arguello-Astroga GR, Rivera-Bustamante RF (1999) First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatan Mexico. *Plant Disease* 83:1178.
- Ávila AC de, Inoue-Nagata AK, Costa H, Boiteux LS, Neves LOQ, Prates RS, Bertini LA (2004) Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira* 22:489-492.
- Azevedo SM, Faria MV, Maluf WR, de Oliveira ACB, de Freitas JA (2003) Zingiberene-mediated resistance to the South American tomato pinworm derived from *Lycopersicon hirsutum* var. *hirsutum*. *Euphytica* 134:347-351.
- Azevedo SM, Maluf WR, Faria MV, Oliveira ACB, Ribeiro CA, Gonçalves-Gervasio EC, Santa-Cecília LVC (1999) Resistência a traça (*Tuta absoluta*) em genótipos de tomateiro com diferentes teores de sesquiterpenos nos folíolos. In: Congresso Brasileiro de Olericultura 39. Resumo. Sociedade Brasileira de Olericultura p.38.
- Bai Y, van der Hulst R, Bonnema G, Marcel BC, Meijer-Dekens F, Niks RE, Lindhout P (2005) Tomato defense to *Oidium neolycopersici*: Dominant *Ol* genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive *ol-2*. *Molecular Plant Microbe Interact* 18:354-362.
- Bailey, D.M (1941) The seedling test methods for root-knot nematode resistance. *Proceedings of American Society for Horticultural Science* 38:573-575.
- Baldin ELL, Vendramin JD, Lourenção AL (2005) Resistência de genótipos de tomateiro à mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyroididae). *Neotropical Entomology* 34:435-441.
- Barcelos FF, Barbosa LCA, Demuner AJ, Santos MA (1997) Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna aterrina*. *Química Nova* 2 (Supl.):PN074-PN074.

- Bardakci F (2001) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology* 25:185-196.
- Barker KR (2003) Perspectives on plant and soil nematology. *Annual Review of Phytopathology* 41:1-25.
- Barten JHM, Thome CH, Stevens MR, Schuster DJ, Scott JW, Chambliss OL (1994) Evaluating resistance in tomato to the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica* 22: 330-331.
- Bauman P, Munson MA, Lai C-Y, Clark MA, Bauman L, Moran NA, Campbell BC (1993) Origin and properties of bacterial endosymbionts of aphids, whiteflies, and mealybugs. *American Society for Microbiology News* 59:21-24.
- Berry SD, Fondong VN, Rey C, Rogan D, Fauquet CM, Brown JK (2004) Molecular evidence for five distinct *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) geographic haplotypes associated with cassava. *Plants in Sub-Saharan Africa* 97:852-859.
- Bezerra IC, Lima MF, Ribeiro SG, Giordano LB, Ávila AC (1997) Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22(Supl.):331.
- Bezerra IC, Ribeiro SG, Giordano LB (1996) Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. *Virus Review and Research* 16:289.
- Bian Xue-Yu, Thomas MR, Rasheed MS, Saeed M, Hanson P, de Barro PJ, Rezaian MA (2007) A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology* 97:930-937.
- Bird J, Maramorosh K (1978) Viruses and virus diseases associated with whiteflies. *Advances in Virus Research* 22:55-110.
- Boiteux LS, Fonseca MEN, Simon PW (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:32-38.
- Boiteux LS, Oliveira VR, Silva CH, Makishima N, Inoue-Nagata, AK, Fonseca MEN, Giordano LB (2007) Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. *Horticultura Brasileira* 25:20-23.
- Bosco D, Mason G, Accotto GP (2004) TYLCSV DNA, but not infectivity, can be transovarially inherited by the progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Virology* 323:276-283.
- Bost SC, Triantaphyllou AC (1982) Genetic basis of the epidemiologic effects of resistance to *Meloidogyne incognita* in the tomato cultivar Small Fry. *Journal of Nematology* 14:540-544.

- Briddon RW (2003) Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology* 4:427-434.
- Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X, Fauquet CM (2008) Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA- $\beta$  satellites of begomoviruses. *Archives of Virology* 153: 763-781.
- Briddon RW, Markham PG (1995) Family *Geminiviridae*. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (eds.) *Virus Taxonomy*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna and New York: Spronger-Verlag, pp. 158-165.
- Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, Markham PG (1990) Geminivirus coat protein replacement alters insect specificity. *Virology* 177:85-94.
- Brown JK (1994) Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agro-ecosystems worldwide. Serie: Boletín Fitosanitario. FAO 42:3-32.
- Brown JK (1997) The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. In: Stacey GE, Keen NT (eds). *Plant-Microbe Interactions*. New York, ITP. pp.125-195.
- Brown JK (2000) Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. *Virus Research* 71:233-260.
- Brown JK (2007) The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives begomovirus spread and virus diversification. *Plant Disease APSNet Feature*, January 2007. <http://www.apsnet.org/online/feature/btabaci/>.
- Brown JK, Bird J (1992) Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76:220-225.
- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC (1995) The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* 40:511-534.
- Burke BA, Goldsby G, Mudd JB (1987) Polar epicuticular lipids of *Lycopersicon pennellii*. *Phytochemistry* 26:2567-2571.
- Caciagli P, Bosco D, Al-Bitar L (1995) Relationships of the Sardinian isolate of tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*. *European Journal of Plant Pathology* 101:163-170.
- Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide 'primers'. *Biotechnology* 9:553-556.
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff H, Sandal NN, Marcker KA, Klein-Lankhorst RM, Salentijn EMJ, Lange W, Stiekema W, Wyss U, Grundler FMW, Jung C (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275:832-834.

- Calegário RF, Ferreira, SS, Andrade EC, Zerbini, FM (2007) Caracterização do *Tomato yellow spot virus*, um novo begomovírus isolado de tomateiro no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42:1335-1343.
- Carneiro MS, Camargo LEA, Coelho ASG, Vencovsky R, Leite-Júnior RP, Stenzel NMC, Vieira MLC (2002) RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *Genome* 45:670-678.
- Castro AP de, Blanca JM, Díez MJ, Vinãls FN (2007) Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *European Journal of Plant Pathology* 117:347-356.
- Chague V, Mercier JC, Guenard M, de-Courcel A, Vedel F (1996) Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 92:1045-1051.
- Chague V, Mercier JC, Guenard M, de-Courcel A, Vedel F (1997) Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 95:671-677.
- Channarayappa SG, Muniyappa V, Frist RH (1992) Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. *Canadian Journal of Botany* 70:2184-2192.
- Chao S, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EJ, Koebner RMD, Gale MD (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 78:495-504.
- Charchar JM, Gonzaga V, Giordano LB (1998) Perda de produtividade de tomateiro causada por infecção de uma população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica*. *Fitopatologia Brasileira* 23(Supl.):303.
- Chen R, Zhang LY, Zhang J-H, Zhang W, Wang X, Ouyang B, Li H-X, Ye Z-B (2006) Functional characterization of *Mi*, a root-knot nematode resistance gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Journal of Integrative Plant Biology* 48:1458-1465.
- Chu C, Freeman TP, Buckner JS, Henneberry TJ, Nelson DR, Natwick EE (2001) Susceptibility of upland cotton cultivars to *Bemisia tabaci* Biotype B (Homoptera : Aleyrodidae) in relation to leaf age and trichome density. *Annals of the Entomological Society of America* 94:743-749.
- Chu CC, Henneberry TJ, Cohen AC (1995) *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae): host preference and factors affecting oviposition and feeding site preference. *Environmental Entomology* 24:354-360.
- Cipriani G, Lot G, Huang W-G, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99:65-72.

Clark MA, Bauman L, Munson MA, Bauman P, Campbell BC (1992) The eubacterial endosymbionts of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) constitute a lineage distinct from the endosymbionts of aphids and mealybugs. *Current Microbiology* 25:119-123.

CNPq: Embrapa hortaliças: Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças. [http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/hortalicas\\_em\\_numeros/hortalicas\\_em\\_numeros.htm](http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/hortalicas_em_numeros.htm). In: 22/09/2008.

Cohen S, Antignus Y (1994) *Tomato yellow leaf curl*, a whitefly-borne geminivirus of tomato. *Advances in Disease Vector Research* 10:259-288.

Cohen S, Harpaz I (1964) Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 7:155-166.

Cohen S, Nitzany FE (1966) Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56:1127-1131.

Cooper JJ, Jones AT (1983) Responses of plants to viruses: Proposals for the use of terms. *Phytopathology* 73:127-128.

Costa HS, Brown JK (1990) Variability in biological characteristics, isozyme patterns and virus transmission among populations of *Bemisia tabaci* Genn in Arizona. *Phytopathology* 80:888.

Cunha LCV, Resende RO, Nagata T, Inoue-Nagata AK (2004) Distinct features of *Pepper yellow mosaic virus* isolates from tomato and sweetpepper. *Fitopatologia Brasileira* 29:663-667.

Czosnek H, Khey-Pour A, Gronenborn B, Remetz E, Zeidan M, Altman A, Rabinowitch HD, Vidavski S, Kedar N, Gafni Y, Zamir D (1993) Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) DNA in agroinoculated leaf discs from selected genotypes. *Plant Molecular Biology* 22:995-1005.

Czosnek H, Navot N, Laterrot H (1990) Geographical distribution of tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56:1127-1132.

Darwin SC, Knapp S, Peralta IE (2003) Tomatoes in the Galápagos Islands: morphology of native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity* 1:29-54.

De Barro PJ, Driver F (1997) Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera, Aleyrodidae). *Australian Journal of Entomology* 36:149-152.

De Barro PJ, Trueman JWH, Frohlich DR (2005) *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci*: The molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. *Bulletin of Entomological Research* 95:193-203.

Dianese EC, Resende RO, Inoue-Nagata AK (2008) High incidence of *Pepper yellow mosaic virus* in tomatoes in productive areas of Brazils Federal District. *Tropical Plant Pathology* 33:67-68.

Dimock M, Kennedy G (1983) The role of glandular trichomes in the resistance of *L. hirsutum* f. *glabratum* to *Heliotis zea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 44:263-268.

Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K (1996) The tomato *cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84:451-459.

Doganlar S, Dodson J, Gabor B, Beck-Bunn T, Crossman C, Tanksley SD (1998) Molecular mapping of the *py-1* gene for resistance to corky root rot (*Pyrenochaeta lycopersici*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 97:784-788.

Dropkin VH (1969) The necrotic reaction of tomatoes and other hosts to *Meloidogyne*: Reversal by temperature. *Phytopathology* 59:1632-1637.

Dry I, Krake LR, Rigden JE, Rezaian MA (1997) A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:7088-7093

Ellis J, Dodds P, Pryor T (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* 3:278-284.

Esquinas-Alcázar J, Nuez F (1995) Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. In: Nuez F, (ed). *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundiprensa, Madrid.

Fancelli M, Vendramim JD (2002) Development of *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) biotype B on *Lycopersicon* spp. genotypes. *Scientia Agricola* 59:665-669.

Fancelli M, Vendramim JD, Frighetto RTS, Lourenção AL (2005) Exsudato glandular de genótipos de tomateiro e desenvolvimento de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Sternorrhyncha: Aleyrodidae) biótipo B. *Neotropical Entomology* 34:659-665.

Fancelli M, Vendramim JD, Lourenção AL, Dias CTS (2003) Atratividade e preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em genótipos de tomateiro. *Neotropical Entomology* 32:319-328.

Fargete D, Leslie M, Harrison BD (1996) Serological studies on the accumulation and localization of three tomato leaf curl geminiviruses in resistant and susceptible *Lycopersicon* species and tomato cultivars. *Annals of Applied Biology* 128:317-328.

Faria JC, Bezerra IC, Zerbini FM, Ribeiro SG, Lima MF (2000) Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 25:125-137.

Faria JC, Souza-Dias JAC, Slack S, Maxwell DP (1997) A new geminivirus associated with tomato in the state of Sao Paulo Brazil. *Plant Disease* 81:423-423.



Faria JC, Zerbini FM (2000) Família *Geminiviridae* - Taxonomia, replicação e movimento. Revisão Anual de Patologia de Plantas 8:27-57.

Fauquet C, Briddon R, Brown J, Moriones E, Stanley J, Zerbini, M Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature, Archives of Virology 153:783-821.

Fauquet CM, Stanley TJ (2005) Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. Archives Virology 150:2151-2179.

Fernandes FR, Albuquerque LC de, Giordano L de B, Boiteux LS, Ávila AC de, Inoue-Nagata AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. Virus Genes 36:251-258.

Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EPB, Zerbini FM (2006) Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. Plant Pathology 55:513-522.

Fernández-Muñoz R, Domínguez E, Cuartero J (2000) A novel source of resistance to the two-spotted spidermite in *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill.: its genetics as a Vected by interplot interference. Euphytica 111:169-173.

Fernández-Muñoz R, Salinas M, Álvarez M, Cuartero J (2003) Inheritance of resistance to two-spotted spidermite and glandular leaf trichomes in wild tomato *Lycopersicon pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. Journal of the American Society Horticultural Science 128:188-195.

Ferraz LCCB, Churata-Masca MGC (1983) Comportamento de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*. Mill) de crescimento determinado em relação ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. Cientifica 11:87-91.

Ferreira ME, Grattapaglia, D (1996) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa/Cenargem. Brasília DF, 220 p.

Ferreira PTO, Bezerra IC, Villas Bôas GL, Ribeiro SG, Giordano LB (1999) Avaliação de fontes de resistência a isolado de geminivírus com genoma bipartido transmitido por *Bemisia argentifolli* em *Lycopersicon* spp. Fitopatologia Brasileira 24:131-135.

Flores E, Silberschmidt K, Kramer M (1960) Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. O Biológico 26:65-69.

Font I, Martinez-Culebras P, Gomila J, Jordá C (2002a) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in the Balearic Islands. Journal of Plant Pathology 84:69.

Font I, Martinez-Culebras P, Jordá C (2002b) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* - Is (TYLCV-Is) in the Canary Islands. Plant Disease 84:69.

Fontes PCR, Silva DJH (2002) Produção de tomate de mesa. Viçosa: Aprenda fácil. pp. 196.

- Foolad MR (2007) Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics* 2007:1-53.
- Foolad MR, Jones RA, Rodriguez RL (1993) RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Reports* 12:293-297.
- França FH, Villas Boas GL, Castelo Branco M (1996) Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25:369-372.
- Fraser RSS (1990) The genetics of resistance to plant-viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28:179-200.
- Freitas JA, Maluf WR, Cardoso MG, Gomes LAA, Bearzotti E (2002b) Inheritance of foliar zingiberene contents and their relationship to trichome densities and whitefly resistance in tomatoes. *Euphytica* 127:275-287.
- Freitas JA, Nonato MFB, Souza VS, Maluf WR, Ciociola JR AI, Leite GLD (2002a) Relações entre acilaçúcares, tricoma glandular e resistência do tomateiro a mosca branca. *Acta Scientiarum* 24:1313-1316.
- Freitas-Astúa J, Purcifull DE, Polston, JE, Hiebert E (2002) Traditional and transgenic strategies for controlling tomato-infecting begomoviruses. *Fitopatologia Brasileira* 27:437-449.
- Friedmann M, Lapidot M, Cohen S, Pilowsky M (1998) Novel source of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* exhibiting a symptomless reaction to viral infection *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 1004-1007.
- Fritsch P, Rieseberg LH (1996) The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith, TB, Wayne, RK (eds.) *Molecular genetic approaches in conservation*. New York. Oxford University Press.
- Frodin DG (2004) History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53:753-776.
- Galvão RM, Mariano AC, Luz DF, Alfenas PF, Andrade EC, Zerbini FM, Almeida MR, Fontes EPB (2003) A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology* 84:715-726.
- Ganal MW, Simon R, Brommonschenkel SH, Arndt M, Phillips MS, Tanksley SD, Kumar A (1995) Genetic mapping of a wide spectrum nematode resistance gene (*Hero*) against *Globodera rostochiensis* in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:886-891.
- García-Cano E, Resende RO, Boiteux Leonardo S, Giordano LB, Fernandez-Muñoz R, Moriones E (2008) Phenotypic expression, stability and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology* 98:618-627.

Gawell NJ, Bartlett AC (1993) Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Molecular Biology* 2:33-38.

Ghanim M, Czosnek H (2000) *Tomato yellow leaf curl geminivirus* (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *Journal of Virology* 74:4738-4745.

Ghanim M, Morin S, Zeidan M, Czosnek H (1998) Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 240:295-303.

Ghanim M, Sobol I, Ghanim M, Czosnek H (2007) Horizontal transmission of begomoviruses between *Bemisia tabaci* biotypes. *Arthropod-Plant Interactions* 1:195-204.

Gilardón E, Pocovi M, Hernández C, Olsen A (2001) Papel dos tricomas glandulares da folha do tomateiro na oviposição de *Tuta absoluta*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:585-588.

Gilbert J, Mcguire DC (1956) Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 68:437-442.

Giordano LB, Bezerra IC, Ferreira PTO, Borges Neto CR (1999) Breeding tomatoes for resistance to whitefly-transmitted geminivirus with bipartite genome in Brazil. *Acta Horticulturae* 487:357-360.

Giordano LB, de Ávila AC, Charchar JM, Boiteux LS, Ferraz E (2000) Viradoro: A *Tospovirus*-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *HortScience* 35:1368-1370.

Giordano LB, Fonseca MEN, Silva JBC, Inoue-Nagata, AK, Boiteux, LS (2005b) Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* 23:815-818.

Giordano LB, Silva Lobo VL, Santana FM, Fonseca MEN, Boiteux LS (2005a) Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143:27-33.

Goffreda JC, Steffens JC, Mutschler MA (1990) Association of epicuticular sugars with aphid resistance in hybrids with wild tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115: 161-165.

Gonçalves LSA, Rodrigues R, Sudré CP, Bento CS, Moulin MM, Araújo ML, Daher RF, Pereira MG (2008) Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. *Horticultura Brasileira* 26: 364-370.

Gordillo LF, Stevens MR, Millard MA, Geary B (2008) Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease* 92:694-704.

Gotmisky SA, Kokaeva ZG, Bobrova VK (1999) Use of molecular marker for the analysis of plant genome. *Research Journal Genetics* 11:538-549.

Grattapaglia D, Ferreira ME (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: Embrapa-Cernagen.

Grattapaglia D, Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121-1137.

Green SK, Tsai WS, Shih SL (2002) Molecular characterization of a new begomovirus associated with *Tomato yellow leaf curl* and Eggplant yellow mosaic diseases in Thailand. *Plant Disease* 87:446.

Guo ZH, Weston PA, Snyder JC (1993) Repellency to 2-spotted spider-mite, *Tetranychus urticae* Koch, as related to leaf surface chemistry of *Lycopersicon hirsutum* accessions. *Journal of Chemical Ecology* 19: 2965-2979.

Haji, FNP, Alencar JA, Lima MF, Mattos MAA, Honda OT, Haji AT (1997) Avaliação de produtos para o controle da mosca-branca (*Bemisia* spp.) na cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Petrolina: Embrapa-CPATSA, 6p.

Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T (1982) A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79:6465-6469.

Hanley-Bowdoin L, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (1999) Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical reviews in Plant Sciences* 18:71-106.

Hanson P, Green SK, Kuo G (2006) *Ty-2*, a gene in chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetic Cooperative Report* 56:17-18.

Hanson PM, Bernacchi D, Green S, Tanksley SD, Muniyappa V, Padmaja AS, Mei C.-H, Kuo G, Fang D, Tzu CJ (2000) Mapping a wild tomato introgression associated with *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in a cultivated tomato line. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125:15-20.

Harrison BD (1985) Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:55-82.

Hassan AA, Abdel-Ati KEA (1999) Genetics of tomato yellow leaf curl virus tolerance derived from *Lycopersicon pimpinellifolium* and *Lycopersicon pennellii*. *Egyptian Journal of Horticulture* 26:323-338.

- Hassan AA, Mazyad HM, Moustafa SE, Nakla MK (1982) Assessment of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in the genus *Lycopersicum*. *Egyptian Journal of Horticultural* 9:103-116.
- Hassan AA, Mazyad HM, Moustafa SE, Nakla MK, Sims WL (1984) Inheritance of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon cheesmanii* and *Lycopersicon hirsutum*. *Hortscience* 19:574-575.
- Hawthorne DJ, Shapiro JA, Tingey WM, Mutschler MA (1992) Trichome-borne and artificially applied acylsugars of wild tomato deter feeding and oviposition of the leafminer *Liriomyza trifolii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 65:65-73.
- Heinz KM, Zalom FG (1995) Variation in trichome-based resistance to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition on tomato. *Journal of Economic Entomology* 88:1494-1502.
- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Shaefer A, Nienhuis J (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical Applied Genetics* 72:761-769.
- Höfer P, Bedford ID, Markham PG, Jeske H, Frischmuth T (1997) Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* 236:288-295.
- Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE, Redinbaugh, MG (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 46:327-359.
- Horowitz AR, Ishaaya I (1995) Chemical control of *Bemisia*-management and application. In: Gerling D, Mayer RT (eds) *Bemisia: Taxonomy, biology, damage, control and management*. Intercept. pp. 537-556.
- Hou YM, Paplomatas EJ, Gilbertson RL (1998) Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. *Molecular-Microbe Interactions* 11: 208-217.
- Huang C, De Putte PM, Hoefs-Van, Der Meer J, Haanstra-Van G, Meijer-Dekens F, Lindhout P (2000) Characterization and mapping of resistance to *Oidium lycopersicum* in two *Lycopersicon hirsutum* accessions: evidence for close linkage of two *Ol*- genes on chromosome 6 of tomato. *Heredity* 85:511-520.
- Hull R (2002) *Matthews Plant Virology*, 4<sup>th</sup> ed. Academic Press. San Diego.
- ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. Acesso em 15/11/2008
- Idris AM, Brown JK (1998) *Sinaloa tomato leaf curl geminivirus*: biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. *Phytopathology* 88:648-657.

Ingram DM, Henn A (2001) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Mississippi. *Plant Disease* 85: 1287

Inoue-Nagata AK, Martin DP, Boiteux LS, Giordano L de B, Agassie ICB, Ávila AC de (2006) New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting *Begomovirus* complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1329-1332.

Ishikawa H (1984) Characterization of the protein species synthesized *in vivo* and *in vitro* by an aphid endosymbiont. *Insect Biochemistry* 14:417-425.

Ji Y, Scott JW (2006) *Ty-3*, a begomovirus resistance locus linked to *Ty-1* on chromosome 6. Report of the Tomato Genetics Cooperative. 56:22-25.

Ji Y, Scott JW, Hanson P, Graham E, Maxwell DP (2007) Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. In: Czosnek H (ed.) *Tomato yellow leaf curl virus* disease: Management, molecular biology, Breeding for resistance. Kluwer, Dordrecht (in press).

Jianhua S, Narabu T, Misukubo T, Hibi T (2001) A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. *Nematology* 91:377-382.

Jones DA, Dickinson MJ, Balint-Kurti PJ, Dixon MS, Jones JDG (1993) Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of the *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 6:348-357.

Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JDG (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 226:789-793.

Jones DR (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109:195-219.

Juvik J, Babka B, Timmermann E (1988) Influence of trichome exudates from species of *Lycopersicon* on oviposition behavior of *Heliothis zea* Boddie. *Journal of Chemical Ecology* 14:1261-1287.

Juvik JA, Shapiro JA, Young TE, Mutschler MA (1994) Acylglucosides from wild tomatoes alter behavior and reduce growth and survival of *Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 87:482-492.

Kaloshian I, Lange WH, Williamson VM (1995) An aphid-resistance locus is tightly linked to the nematode-resistance gene, *Mi*, in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:622-625.

Kang NJ, Joung JI, Shon YG, Jung HB, Cho YS, Kim HT (2002) Identification of Randomly Amplified Polymorphic DNA markers linked to the gene for resistance to

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (race 1) in tomato. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 43:545-548.

Kasrawi MA (1989) Inheritance of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in *Lycopersicon pimpinellifolium*. Plant Disease 73:435-437.

Kasrawi MA, Mansour A (1994) Genetics of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato. Journal of Horticultural Science 69:1095-1100.

Kasrawi MA, Suwwan MA, Mansour A (1988) Sources of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in *Lycopersicon* species. Euphytica 37:61-64.

Khasdan V, Levin I, Rosner A, Morin S, Kontsedalov S, Maslenin L, Horowitz AR (2005) DNA markers for identifying biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera, Aleyrodidae) and studying population dynamics. Bulletin of Entomological Research 95:605-613.

Kijas JMH, Fowler JCS, Thomas MR (1995) An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. Genome 38:349-355.

Klein-Lankhorst RM, Vermut A, Weide R, Liharska T, Zabel P (1991) Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Theoretical Applied Genetics 83:108-114.

Kongkiatngam P, Waterway MJ, Fortin MG (1995) Genetic variation within between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme and RAPD markers. Euphytica 84:237-246.

Kunik T, Salomon R, Zamir D, Navot N, Zeidan M, Michelson I, Gafni Y, Czosnek H (1994) Transgenic tomato plants expressing the *Tomato yellow leaf curl virus* capsid protein are resistant to the virus. Bio-Technology 12:500-504.

Kurozawa C, Pavan MA (1997) Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Kimati H, Amorin L, Bergaim Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (Eds.). Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. vol.2. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ceres. pp. 690-719.

Lacerda DR, Acedo MDP, Filho JPL, Lovato NB (2002) A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. Lundiana 3:87-92.

Lapidot M, Friedmann M (2002) Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. Annals of Applied Biology 140:109-127.

Lapidot M, Friedmann M, Pilowsky M, Ben Joseph R, Cohen S (2001) Effect of host plant resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. Phytopathology 91:1209-1213.

- Lapidot M, Friedmann M, Lachman O, Yehezkel S, Nahon S, Cohen S, Pilowsky M (1997) Comparison of resistance level to *Tomato yellow leaf curl virus* among commercial cultivars and breeding lines Plant Disease 81:1425-1428.
- Lapidot M, Golray O, Ben-Joseph R, Cohen M, Friedmann Sholmo A, Nahon S, Chen L, Pilowsky M (2000) Breeding tomatoes for resistance to *Tomato yellow leaf curl begomovirus* EPPO Bulletin 30:317-321.
- Lapidot MR, Ben Joseph R, Cohen L, Machbash Z, Levy D (2006) Development of a scale for evaluation of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance level in tomato plants Phytopathology 96:1404-1408.
- Laterrot H (1993) Present state of the genetic control of *Tomato yellow leaf curl virus* and of the EEC-supported breeding programme. In: Stamova L. (Ed.), Eucarpia Tomato-93. Proceedings XII th Eucarpia Meeting on Tomato Genetics and Breeding, Bulgaria. pp.19-24.
- Laterrot H (1995) Breeding network to create tomato varieties resistant to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Fruits 50:439-444.
- Lei JD, Agrios GN (1986) Mechanisms of resistance in corn to *Mayze dwarf mosaic virus*. Phytopathology 79:757-761.
- Liedl BE, Lawson DM, Shapiro JA, White KK, Cohen DE, Carson WG, Trumble JT, Mutschler MA (1995). Acylsugars of wild tomato *Lycopersicon pennellii* (Corr.) D'Arcy alters settling and reduces oviposition of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Economic Entomology 88:742-748.
- Lima ACS, Lara FM (2004) Resistência de genótipos de soja à mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) Neotropical Entomology 33:71-75.
- Lima JAA, Gonçalves MFB, Oliveira VB, Torres Filho, J, Miranda ACMM (1999) Immunochemical and PCR identification of a *Begomovirus* infecting tomato fields in Ibiapaba Mountain, Ceará. Virus: Reviews and Research 4:150.
- Lima LHC, Campos L, Moretzsohn MC, Návia D, Oliveira MRV (2002) Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. Genetics and Molecular Biology 25:217-223.
- Lima LHC, Návia D, Inglis PW, Oliveira MRV (2000) Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera, Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. Genetics and Molecular Biology 23:1-5.
- Lopes CA, Ávila AC (2005) Doenças do Tomateiro. 2<sup>a</sup>. ed. Brasília DF: Embrapa Hortaliças. 151 p.
- Lordelo LGE (1988) Nematóides das Plantas Cultivadas. 8<sup>a</sup> ed. São Paulo: Livraria Nobel S.A. 197 p.



Lourenção AL, Nagai H (1994) Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia* 53:53-59.

Lourenção AL, Nagai H, Siqueia WJ, Melo AMT, Usberti Filho JA, Fonte LC, Melo PC (1999) Resistência de linhagens avançadas de tomateiro a tospovírus. *Bragantia* 58:293-303.

Luckwill LC (1943) The Genus *Lycopersicon*: An Historical, Biological and Taxonomic Survey of the Wild and Cultivated Tomatoes. Aberdeen University Press, Aberdeen, Reino Unido.

Maliepaard C, Bas N, Van Heusden S, Kos J, Pet G, Verkerk R, Vrieling R, Zabel P, Lindhout P (1995) Mapping of QTLs for glandular trichome densities and *Trialeurodes vaporariorum* (greenhouse whitefly) resistance in an F<sub>2</sub> from *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. *Heredity* 75:425-433.

Maluf WR, Barbosa LV, Cecília LVC (1997) 2-Tridecanone-mediated mechanisms of resistance to the South American tomato pinworm *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick, 19170 (Lepidoptera: Gelechiidae) in *Lycopersicon* spp. *Euphytica* 93:189-194.

Maranca G (1981) Tomate: variedades, cultivo, pragas e doenças comercialização. 3ª Ed. São Paulo. Nobel. 118 p.

Marín FM (2004) Busqueda de estratégias de control frente a los Begomovirus que afectan a tomate y judía en España. Tesis Doctoral. Algarrobo-Costa España.

Martin GB, Williams JGK, Tanksley SD (1991) Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random 'primers' and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:2336-2340.

Martínez AAK, Morales FJG, Cabrera FAV (2008) Caracterización molecular de un begomovirus del tomate en el Valle del Cauca, Colombia, y búsqueda de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. *Acta Agronómica* 57:167-173.

Martinez-de-Irarduya O, Nombela G, Hwang CF, Williamson VM, Muniz M, Kaloshian I (2004) *Rme1* is necessary for *Mi-1*-mediated resistance and acts early in the resistance pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17:55-61.

Mccouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical Applied Genetics* 76:815-829.

Meagher -Junior RL, Smith CW, Smith WJ (1997) Preference of *Gossypium* genotypes to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 90:1046-1052.

Mehta P, Wyman JA, Nakhla MK, Maxwell DP (1994) Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87:1291-1297.

- Melo PCT, Boiteux LS, Vilela NJ, Ferraz E (2008) Tomate para Processamento Industrial. In: ACS Albuquerque; AG Silva. (Org.). Desenvolvimento da Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas. Brasília-DF: Embrapa. pp. 547-556.
- Melo PCT, Vilela NJ (2005) Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* 23:153-156.
- Messeguer R, Ganal M, Vicente MC, Young ND, Bolkan H, Tanksley SD (1991) High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 82:529-536.
- Meunier JR, Grimont PA (1993) Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology* 144:373-379.
- Michelson I, Zamir D, Chosnek H (1994) Accumulation and translocation of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology* 34:928-933.
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1319.
- Momol MT, Simone GW, Dankers W, Sprenkel RK, Olson SM, Momol EA, Polston JE, Hiebert E (1999) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato in Georgia. *Plant Disease* 83:487.
- Monci F, Navas-Castillo J, Cenis JL, Lacasa A, Benazoun A, Moriones E (2000) Spread of *Tomato yellow leaf curl Sardinia* from the Mediterranean Basin: Presence in the Canary Islands and Morocco. *Plant Disease* 64:490.
- Monci F, Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E (2002) A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303:317-324.
- Morales FJ (2001) Conventional breeding for resistance to *Bemisia* transmitted geminiviruses. *Crop Protection* 20:825-834.
- Morales FJ, Anderson PK (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146:415-441.
- Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H, Verbeek M, Van den Heuvel JFJM (1999) The GroEL homologue was immunolocalized to a coccoid-shaped whitefly endosymbiont. *Virology* 30:75-84.
- Moriones E, Arno J, Accotto GP, Noris E, Cavallarin L (1993) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Spain. *Plant Disease* 77:953.

- Moriones E, Navas-Castillo J (2000) *Tomato yellow leaf curl virus* an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71:123-134.
- Moura RM (1997) O gênero *Meloidogyne* e a meloidogynose Parte II. Revisão Anual de Patologia de Plantas 5:281-315.
- Moya A, Guirãõ P, Cifuentes D, Beitia F, Cenis JL (2001) Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera, Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Molecular Ecology* 10:891-897.
- Muigai SG, Bassett MJ, Shuster DJ, Scott JW (2003) Greenhouse and field screening of wild *Lycopersicon* germplasm for resistance to the whitefly *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica* 31:27-38.
- Muigai, SG, Schuster DJ, Snyder JC, Scott JW, Bassett MJ, Mcauslane HJ (2002) Mechanisms of resistance in *Lycopersicon* germplasm to the whitefly *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica* 30:347-360.
- Nagata T, Almeida ACL, Resende RO, Ávila AC (2004) The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology* 53:136-140.
- Navas-Castillo J, Sánchez-Campos S, Noris E, Louro D, Accotto GP, Moriones E (2000) Natural recombination between *Tomato yellow leaf curl virus-Is* and *Tomato leaf curl virus*. *Journal of General Virology* 81:2797-2801.
- Nízio DAC, Maluf WR, Figueira AR, Nogueira DW, Silva VF, Neto ACG (2008) Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular co-dominante ligado ao gene *Ty-1*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:1699-1705.
- Nombela G, Beitia F, Muniz M (2000) Variation in tomato host response to *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) in relation to acyl sugar content and presence of the nematode and potato aphid resistance gene *Mi*. *Bulletin of Entomological Research* 90:161-167.
- Nombela G, Williamson VM, Muñoz M (2003) The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant Microbe Interact* 16:645-649.
- Noueiry AO, Lucas WJ, Gilbertson RL (1994) Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. *Cell* 76: 925-932.
- Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F (1995) RAPD markers linked to the *Tomato mosaic virus* resistance gene, *Tm-1*, in tomato. *The Japanese Journal of Genetics* 70:179-184.
- Oliveira MRV, Henneberry TJ, Anderson P (2001) History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* 20:709-723.
- Olthof THA, Potter JW (1977) Effects of population densities of *Meloidogyne hapla* on growth and yield of tomato. *Journal of Nematology* 9:296-300.

- Orozco BM, Hanley –Bowdoin LA (1996) DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology* 70:148-158.
- Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) "Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination". *Virology* 265:218-225.
- Painter RH (1951) *Insect resistance in crop plants*. New York, Macmillan.
- Palmer KE, Rybicki EP (1998) The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research* 50:183-234.
- Pamplona AMSR (2001) Avaliação de genótipos de tomate *Lycopersicon* ssp. Com diferentes concentrações de açúcares, quanto à resistência a *Bemisia tabaci* (Gennadius, 19880 (Hemiptera: Aleyrodidae). Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.
- Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical Applied Genetics* 85:985-993.
- Parlevliet JE (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* 17:203-222.
- Pazinato BC, Galhardo RC (1997) *Processamento artesanal do tomate*, 2 impressão. Campinas. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. 30 p.
- Penner GA, Busch A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molner SJ, Fedak G (1993) Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Applied* 2:341-345.
- Peralta ER, Knapp S, Spooner DM (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* Section: *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany* 30:424-434.
- Perring TM (2001) The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection* 20:725-737.
- Perring TM, Cooper AD, Rodriguez RJ, Farrar CA, Bellows Jr TS (1993) Identification of a whitefly species by genomic and behavioural studies. *Science* 259:74-77.
- Picó B, Díez MJ, Nuez F (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus* - a review. *Scientia Horticulturae* 67:151-196.
- Picó B, José Díez MA, Nuez F (1999). Improved diagnostic techniques for *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato breeding programs. *Plant Disease* 83:1006-1012.
- Pietersen G, Smith MF (2002) *Tomato yellow leaf curl virus* resistance tomatoes show resistance to tomato curly stunt virus. *Plant Disease* 86:528-534.

- Pillen K, Ganal MW, Tanksley SD (1996) Construction of a high-resolution genetic map and YAC-contigs in the tomato *Tm-2a* region. *Theoretical and Applied Genetics* 93:228-233.
- Pilowsky M, Cohen S (1990) Tolerance to *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Disease* 74:248-250.
- Pilowsky M, Cohen S (2000). Screening additional wild tomatoes for resistance to the whitefly-borne tomato yellow leaf. *Acta Physiologiae Plantarum* 22: 351-353.
- Pilowsky M, Cohen, S (1995) Breeding tomatoes tolerant to the whitefly borne *Tomato yellow leaf curl virus*. First International Symposium on *Solanaceae* for fresh market Málaga, Espanha. p.138.
- Polston JE, Anderson PK (1999) Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por moscas blancas en tomate en el Hemisferio Occidental. *Manejo Integrado de Plagas* 53:24-42.
- Polston JE, Bois D, Serra CA, Concepción S (1994) First report of Tomato yellow leaf curl-like geminivirus from tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 78: 831.
- Pregnoatto W, Pregnoatto NP (1985) Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 317 p.
- Rajput SG, Wable KJ, Sharma KM, Kubde PD, Mulay AS (2006) Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in Tomato *African Journal of Biotechnology* 5:108-112.
- Ramos PL, Guerra O, Dorestes V, Ramírez N, Rivera-Bustamante R, Oramás P (1996) Detection of TYLCV in Cuba *Plant Disease* 81:1095.
- Resende JTV (2003) Resistência a artrópodos-pragas, mediadas por acilaçúcares em tomateiros obtidos do cruzamento interespecífico de *Lycopersicon esculentum* Mill Tom -584 x *Lycopersicon pennellii*. LA-716. Tese de Doutorado- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Rezende EA, Filgueira FAR, Zerbini FM, Maciel-Zambolim E, Fernandes JJ, Gilbertson RL (1996) Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia - MG, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 21:424.
- Ribeiro SG, Ambrozevícius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegário RF, Fernandes JJ, Lima MF, Mello RN, Rocha HC, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Archives of Virology* 148:281-295.
- Ribeiro SG, Ávila AC, Bezerra IC, Faria J, Lima MF, Gilbertson RL, Maciel-Zambolin E, Zerbini FM (1998) Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly. *Plant Disease* 82:830.

- Ribeiro SG, Bezerra IC, Lima MF, Ávila AC, Giordano LB (1996) Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. Resumos 8<sup>o</sup> Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, SP. p. 290.
- Ribeiro SG, Melo LV, Boiteux LS, Kitajima EW, Faria JC (1994) Tomato infection by a geminiviruses in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19 (Supl.):330.
- Rick CM, Holle M (1990) Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: Genetic variation and its evolutionary significance *Economic Botany* 44:69-78.
- Rick CM, Yoder JI (1988) Classical and molecular genetics of tomato highlights and perspectives. *Annual Review of Genetics* 22:281-300.
- Roberts PA, Dalmaso A, Castagnone-Sereno P (1990) Resistance in *Lycopersicon peruvianum* to isolates of *Mi* gene -compatible *Meloidogyne* populations. *Journal of Nematology* 22:585-589.
- Roberts PA, Matheus W, Veremis JC (1998) Genetic Mechanisms of host-plant resistance to nematodes. In: *Plant and nematode interactions*. Madison, Wisconsin, USA. pp. 209-238.
- Roberts PA, May DM (1986) *Meloidogyne incognita* resistance characteristics in tomato genotypes developed for processing. *Journal of Nematology* 18:353-359.
- Rochester DE, Depaulo JJ, Fauquet CM, Beachy RN (1994) Complete nucleotide-sequence of the geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus*, Thailand isolate. *Journal of General Virology* 75:477-485.
- Rodríguez AE, Tingey WM, Mutschler MA (1992) Acylsugars produced by type IV trichomes of *Lycopersicon pennellii* condition resistance to green peach aphid (*Myzus persicae*). Report *Tomato Genetics Cooperative* 42:36-37.
- Rodríguez-López MJ, Bonani JP, Garzo E, Fereres A, Moriones E, Fernández-Muñoz R (2008) Resistance to *Bemisia tabaci* from wild tomato *Solanum pimpinellifolium* L. accession TO-937 as control method in Tomato yellow leaf curl disease spread. 3rd European Whitefly Symposium S5. 101. Aguadulce (Almería).
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347.
- Rojas MRT, Kon T, Natwick ET, Polston JE, Akad F, Gilbertson RL (2007) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* associated with Tomato yellow leaf curl disease in California. *Plant Disease* 91:1056.
- Rom M, Antignus Y, Gidoni D, Pilowsky M, Cohen S (1993) Accumulation of *Tomato yellow leaf curl virus* DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease* 77:253-257.

Rom M, Bar M, Rom A, Pilowsky M, Gidoni D (1995) Purity control of F<sub>1</sub>-hybrid tomato cultivars by RAPD markers. *Plant Breeding* 114:188-190.

Romshe FA (1942) Nematode resistance test of tomatoes. *Proceedings of the American Society for Horticulture Science* 40:423.

Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, Williamson VM (1998) The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:9750-9754.

Rubinstein G, Czosnek H (1997) Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* 78:2683-2689.

Rybicki EP, Briddom RW, Brown JE, Fauquet CM, Maxwell DP, Harrison BD, Markham PG, Stanley J (2000) *Geminiviridae*. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff X, Mayo MA, McGeoch D, Pringle CR, Wickner RB. (eds.) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press New York. pp. 285-297.

Sanderfoot AA, Ingham DJ, Lazarowitz SG (1996) A viral movement protein as a nuclear shuttle. *Plant Physiology* 110: 23-33.

Santana FM, Ribeiro SG, Moita AW, Moreira Junior DJ, Giordano LB (2001). Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122:45-51.

Santos CDG, Ávila AC de, Resende RO (2003) Estudo da interação de um begomovirus isolado de tomateiro com a mosca branca vetora. *Fitopatologia Brasileira* 28:664-673.

Sasser JN (1980) Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64:36-41.

Scott IAW, Workman PJ, Drayton GM, Burnip GM (2007) First record of *Bemisia tabaci* biotype Q in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 60:264-270.

Seal SE, Vandenbosch F, Jeger MJ (2006) Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:23-46.

SGN: Sol Genomics Network. Markers for tomato chromosomes. Disponível em: <http://www.sgn.cornell.edu>. Acesso em 17 dezembro 2008.

Shapiro JA, Steffens JC, Mutschler MA (1994) Acylsugars of the wild tomato *Lycopersicon pennellii* in relation to geographic distribution of the species. *Biochemical Systematics and Ecology* 22:545-561.

- Sidhu GS, Webster JM (1973) Genetic control of resistance in tomato. Identification of genes for host resistance to *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 19:546-550.
- Silva GS, Ferraz SE, Santos JN (1989) Atração, penetração e desenvolvimento de larvas de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Crotalaria* spp. *Nematologia Brasileira* 13:151-163.
- Silva JBC, Giordano LB (2000) Tomate para processamento industrial, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia - Embrapa Hortaliças. 169 p.
- Silva SJC da (2006) Detecção, caracterização molecular e diversidade genética de *Begomovirus* que infectam Fava (*Phaseolus lunatus* L.) Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Alagoas. Alagoas.
- Singh G, Singh OP, Lampasona MP de, Catalán CAN (2003) Studies on essential oils. Part 35: Chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal* 18:62-65.
- Singh N, Singh M, Kumar S, Kumar R, Singh V, Prasanna HC, Rai M (2007) RAPD markers for hybrid seed purity testing in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Current Science* 93:462-467.
- Sinisterra XH, Polston JE, Abouzid AM, Hiebert E (1999) "Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle begomovirus show resistance to virus infection. *Phytopathology* 89:701-706.
- Smith P (1944) Embryo culture of tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society for Horticulture Science* 44:413-416.
- Snyder JC, Simmons AM, Thacker RR (1998) Attractancy. and ovipositional response of adult *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) to type IV trichome density on leaves of *Lycopersicon hirsutum* grown in three day-length regimes. *Journal of Entomology Science* 33:270- 281.
- Souza JC, Reis PR (2003) Principais pragas do tomate para mesa: bioecologia, dano e controle. *Informe Agropecuário* 24:79-92.
- Stevens MR, Lamb EM, Rhoads DD (1995) Mapping the Sw-5 locus for *Tomato spotted wilt virus* resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 90:451-456.
- Subbotin SA, Sturhan D, Chizhov VN, Vovlas N, Baldwin G (2006) Phylogenetic analyses of *Tylenchida* Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology* 8:455-474.
- Tanksley S (1983) Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8.



Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160.

Tihohod O (1993) *Nematologia Agrícola Aplicada*. Jaboticabal. FUNEP. 372 p.

Timmermans MCP, Prem das O, Messing J (1994) Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45:79-112.

Toscano LC, Boiça Júnior AL, Maruyama WI (2002a) Fatores que afetam a oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro. *Neotropical Entomology* 31:631-634.

Toscano LC, Boiça Júnior AL, Maruyama WI (2002b) Nonpreference of whitefly for oviposition in tomato genotypes. *Scientia Agrícola* 59:677-681.

Toscano LC, Santos TM, Boiça Júnior AL (2003) Preferência de *Bemisia tabaci* biótipo B para oviposição em cultivares de algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38:155-160.

Ueda S, Brown JK (2006) First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase I sequence analysis. *Phytoparasitica* 34:405-411.

Valle GE do, Lourenção AL (2002) Resistência de genótipos de soja a *Bemisia tabaci* (Genn) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology* 31:285-295.

Valverde FA, Lotrakul P, Landry AD (2001) First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Louisiana. *Plant Disease* 85: 230.

Van den Heuvel JF, Bruyere A, Hogenhout SA, Ziegler-Graff V, Brault V, Verbeek M, van der Wilk F, Richards K (1997) The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of Virology* 71:7258-7265.

Van den Heuvel JFJM, Verbeek M, Van der Wilk F (1994) Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Journal of General Virology* 75: 2559-2565.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Castens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo JA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner R (eds.) (2000) *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International committee on the Taxonomy of Viruses. Academic Press:New York.

Van Wezel R, Liu H, Tien P, Stanley J, Hong Y (2001) Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus*-China encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14:1125-1128.

- Van-der-Beek JG, Pet G, Lindhout P (1994) Resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon hirsutum* is controlled by an incompletely-dominant gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theoretical and Applied Genetics* 89:467-473.
- Vanitharani R, Chellappan P, Pita JS, Fauquet CM (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 78:9487-9498.
- Varma A, Malathi VG (2003) Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142:145-164.
- Veremis JC, Roberts PA (1996a) Differentiation of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* novel resistance phenotypes in *Lycopersicon peruvianum* and derived bridge-lines. *Theoretical and Applied Genetics* 93:960-967.
- Veremis JC, Roberts PA (1996b) Relationships between *Meloidogyne incognita* resistance genes in *Lycopersicon peruvianum* differentiated by heat sensitivity and nematode virulence. *Theoretical and Applied Genetics* 93:950-959.
- Veremis JC, Roberts PA (2000) Diversity of heat-stable genotype specific resistance to *Meloidogyne* in Maranon races of *Lycopersicon peruvianum* complex. *Euphytica* 111:9-16.
- Veremis JC, Van Heusden AW, Roberts PA (1999) Mapping heat-stable resistance to *Meloidogyne* in *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 98:274-280.
- Vidavski F, Czosnek H (1998) Tomato breeding lines resistant and tolerant to *Tomato yellow leaf curl virus* issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* 88:910-914.
- Vidavski F, Czosnek H, Gazit S, Levy D, Lapidot M (2008) Pyramiding of genes conferring resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from different wild tomato species. *Plant Breeding* 127:625-631.
- Vidavski F, Leviatov S, Milo J, Rabinowitch HD, Kedar N, Czosnek H (1998) Response of tolerant breeding lines of tomato *Lycopersicon esculentum*, originating from three different sources (*L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* and *L. chilense*) to early controlled inoculation by *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Plant Breeding* 117: 165-169.
- Villas Bôas GL, Franca FH, Ávila AC de, Bezerra IC (1997) Manejo integrado da mosca branca. *Bemisia argentifolli*. Brasília: Embrapa-CNH. 11p (Embrapa-CNPq. Circular técnica 9.
- Villas Bôas GL, Nagata AKI, Lima RS, Pereira W, Giordano LB (2003) Avaliação de plantas daninhas como possíveis hospedeiras da mosca-branca. In: 43º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2003, Recife. p.344.
- Villas Bôas, GL, França, Felix H, Paulo JAO, Giordano LB, Boiteux, LS (2002) Avaliação de genótipos de tomateiro para resistência à mosca-branca. In: 42º Congresso Brasileiro de Olericultura Uberlândia. Horticultura Brasileira, Brasília.p. 384.

Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:14147-14152.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.

Wang H, Buckley KJ, Yang X, Buchmann RC, Bisaro DM (2005) Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology* 79:7410-7418.

Wege C, Pohl D (2007). *Abutilon mosaic virus* DNA B component supports mechanical virus transmission, but does not counteract begomoviral phloem limitation in transgenic plants. *Virology* 365: 173-186.

Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18:7213-7218.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak J, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.

Williamson VM, Hussey RS (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8:1735-1745.

Yaghoobi J, Kaloshian I, Wen, Y, Williamson VM (1995) Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 91:457-464.

Yassin TE (1989) Major disease problems of tomato production and their control in the Sudan. *Tomato and pepper production in the tropics. Proceedings of the International symposium on integrated management practices, Tainan, Taiwan.* pp. 561-575.

Yu K, Paul KP (1992) Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Research* 20:2606.

Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Kedar N, Rabinowitch H, Czosnek H, Zamir D (1991) Screening of *Lycopersicon* accessions for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease* 72:279-281.

Zamir D, Ekstein-Michelson I, Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, Van-Oss H, Kedar N, Rabinowitch HD, Czosnek H (1994) Mapping and introgression of *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88:141-146.

Zeidan M, Czosnek H (1994) Acquisition and transmission of *Agrobacterium* by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:792-798.

Zerbini FM, Zambolim EM, Carrijo IV, Gilbertson RL (1996) A new geminivirus isolated from tomatoes from Minas Gerais state, Brazil. *Phytopathology* 86 (Supl.):S1-S1.

Zhou X, Liu Y, Calvert L, Munoz C, Tim-Nape GW, Robinson DJ, Harrison BD (1997) Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal General Virology* 78:2101-2111.