



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**DIVERSIDADE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* E
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES LIGADOS A GENES DE RESISTÊNCIA
EM TOMATEIRO**

AMANDA DE MELO GONÇALVES

Brasília – DF

2015

AMANDA DE MELO GONÇALVES

Diversidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Dr. Leonardo Silva Boiteux

**BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL
BRASIL 2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

GONÇALVES, AMANDA DE MELO.

Diversidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro. /Amanda de Melo Gonçalves.

Brasília, 2015.

Número de páginas 121 p.: il.

Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1 - Murcha de fusário. 2 – Fol. 3 - Melhoramento genético. 4 - *Solanum lycopersicum*. 5 - Diversidade genética.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

*“O otimista é um tolo. O pessimista, um
chato. Bom mesmo é ser um realista
esperançoso”*

Ariano Suassuna

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo suporte emocional e encorajamento para que eu concluísse mais essa etapa na minha vida. A minha mãe pela força e apoio em todos os momentos e por ter ficado tanto tempo sozinha para que eu realizasse mais esta etapa profissional. A minha tia-madrinha Geni e minha prima-irmã Gabi pelo apoio e acolhimento em todas as horas que eu precisei.

À Brunno Gaião pelo suporte, pelo ouvido, pelo abraço, pelo carinho e pelo conforto.

Aos meus amigos de turma do doutorado Fabiane, Nancy e em especial aos meus queridos companheiros de todas as horas Larissa e Fred que sempre me deram suporte em todos os momentos, não só acadêmicos. As companheiras de residência, Luciana, Fernanda, Nataly, Camila, Darly, Daniele, Edilene, Genilda e Jéssica.

Aos amigos da Embrapa Cléia, Maurício, Edivânio, Niday Celma, Rayane, Jeferson, Danilo, Michele, Luiz e Túlio pela companhia diária e pelas risadas. Vocês fizeram meus dias mais felizes.

Aos funcionários do laboratório de Fitopatologia, Fabiana e Luana, amigas queridas, acolhedoras e prestativas e Vagner que estiveram sempre prontos a ajudar. Aos funcionários dos laboratórios de Melhoramento Vegetal e Genômica, Getúlio Chico, Chiquinho e Willian, aos funcionários do campo, em especial Maria e Ronan, sempre solícitos e prontos para ajudar nas atividades.

Aos meus orientadores **Leonardo Boiteux**, pela oportunidade de realizar mais uma etapa da minha vida acadêmica, pelo acompanhamento em todas as atividades realizadas, esclarecendo dúvidas e repassando todo seu conhecimento, por ser sempre solícito e oferecer auxílio para participação em eventos acadêmicos, por estimular sempre minha curiosidade sob diferentes temáticas referentes ao meio científico, por sempre me incluir nas diversas atividades do laboratório e por me fazer sentir parte integrante de sua equipe de pesquisa; ao **Ailton Reis** pela credibilidade e por disponibilizar o laboratório e a coleção de fungos para a realização do trabalho, além do acompanhamento em todas as etapas do trabalho, participando ativamente principalmente nas atividades de casa de vegetação; a **Maria Esther** por compartilhar seus conhecimentos e acompanhar de perto várias etapas, trabalhando na bancada conosco e explicando passo-a-passo as técnicas utilizadas no laboratório, além da paciência em monitorar e auxiliar nas análises de dados.

Ao Hélcio Costa pelo auxílio prestado na obtenção dos isolados utilizados neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, pelos ensinamentos.

Ao meu orientador **Rafael Fernandez Muñoz**, pela receptividade, dedicação, espontaneidade, ensinamentos e auxílio no desenvolvimento do trabalho em tão pouco tempo de convivência.

Aos amigos do Instituto “La Mayora”, Glória, Andrea, Luiz, Maria, Rida, Jorge, Pedro pela receptividade e acolhimento durante a minha curta estadia na Espanha.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a realização das atividades.

A todos aqueles que participaram da minha vida, direta ou indiretamente, durante esses 4 anos,

MUITO OBRIGADA!

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Dr. Leonardo Silva Boiteux**, com apoio (CAPES/ CNPq/ Embrapa) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior /

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

Diversidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro

AMANDA DE MELO GONÇALVES

TESE APROVADA em / / por:

Dr. Fábio Gelape Faleiro
Examinador

Dr. Carlos Alberto Lopes
Examinador

Dr. Cleber Furlanetto
Examinador

Dr. Adalberto Corrêa Café Filho
Examinador

Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux
Orientador (Presidente)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL 2015**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO GERAL	v
GENERAL ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura	1
A cultura do tomateiro	2
A murcha de fusário	4
Agente causal: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	5
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	8
Marcadores Moleculares e aplicações no melhoramento genético do tomateiro	9
Justificativa	13
Objetivos	14
Literatura citada	16
CAPÍTULO 2: Diversidade de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> associados com o cultivo do tomateiro no Brasil	23
RESUMO	24
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	30
Coleção de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	30
Reação de cultivares e acessos diferenciadores a isolados de Fol	31
Caracterização molecular das raças de Fol e de <i>forma specialis</i> dos isolados via PCR o sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006)	32
Caracterização molecular das raças de Fol e de <i>forma specialis</i> dos isolados via PCR com o sistema de marcadores para os genes da série <i>SIX</i>	33
Avaliações de isolados com uma coleção de <i>primers</i> RAPD e busca por marcadores associados com as raças brasileiras de Fol	34
Validação e clonagem dos amplicons polimórficos entre os <i>bulks</i> de raças de Fol .	34
Purificação e clonagem de amplicons RAPD polimórficos	34

Sequenciamento e análise das sequências dos amplicons RAPD polimórficos entre <i>bulks</i> das diferentes raças	35
Desenhos de <i>primers</i> e condições de PCR para a identificação dos potenciais marcadores SCAR raça-específicos derivados de amplicons RAPD polimórficos .	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
Características culturais e morfológicas dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	37
Caracterização de raças de Fol na coleção de isolados empregando ensaios de inoculação em acessos diferenciadores de raças fisiológicas	37
Caracterização molecular das raças de Fol e de <i>forma specialis</i> dos isolados via PCR com o sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006)	39
Caracterização molecular das raças de Fol e de <i>forma specialis</i> dos isolados via PCR com o sistema de marcadores para os genes da série <i>SIX</i>	42
Avaliações de isolados das diferentes raças de Fol com uma coleção de <i>primers</i> RAPD e identificação de marcadores RAPD para as diferentes raças de Fol	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
LITERATURA CITADA	50
CAPÍTULO 3: Busca via <i>bulked segregant analysis</i> de marcadores ligados a fatores de resistência ao <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 1 (gene <i>I</i>) e raça 3 (gene <i>I-7</i>)	66
RESUMO	67
ABSTRACT	68
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS	71
Obtenção de populações segregantes para resistência a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raças 1 e 3	71
Caracterização da População F ₂ (segregante) em casa de vegetação	71
Busca de marcadores RAPD ligados aos fatores de resistência ao Fol via <i>bulked segregant analysis</i> (BSA)	72
Validação dos marcadores RAPD polimórficos entre os parentais com uma amostra da população segregante (F ₂)	73
Purificação de amplicons RAPD polimórficos	73

RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
Obtenção de populações segregantes para resistência a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3	73
Caracterização da População F ₂ (segregante) em casa de vegetação	74
Busca de marcadores do tipo RAPD para monitoramento dos loci de resistência ..	74
Validação dos marcadores RAPD polimórficos entre os parentais com uma amostra da população segregante (F ₂)	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
LITERATURA CITADA	79
CAPÍTULO 4: Busca por marcadores moleculares e genes candidatos associados com a região genômica do cromossomo 11 do tomateiro contendo o gene <i>I</i> de resistência a isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 1	89
RESUMO	90
ABSTRACT	91
INTRODUÇÃO	92
MATERIAL E MÉTODOS	96
Obtenção de população segregante para o locus <i>I</i>	96
Caracterização da reação a um isolado de Fol raça 1 de uma população F ₂ (segregante) em condições de casa de vegetação	96
Validação dos marcadores moleculares SSR 67 e At2 ligados com a resistência a Fol raça 1	97
Sequenciamento e posicionamento físico do marcador SSR67 para delimitação da região contendo o gene <i>I</i>	98
Elaboração de mapa físico da região cromossômica contendo locus <i>I</i> tendo como referências as sequências dos marcadores SSR67 e At2	98
RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
Obtenção de população segregante para o locus <i>I</i>	99
Caracterização da População F ₂ (segregante) em casa de vegetação	100
Validação dos marcadores SSR 67 e At2 associados à região genômica contendo o fator de resistência a isolados de Fol raça 1	100
Elaboração de mapa físico e avaliação genotípica com marcadores ligados a região cromossômica para o locus <i>I</i>	102

Caracterização via análise de sequência do gene candidato nos genótipos parentais contrastantes	105
CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
LITERATURA CITADA	108
CONCLUSÕES GERAIS	118
PERPECTIVAS	121

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2: Diversidade de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> associados com o cultivo do tomateiro no Brasil	23
---	----

Tabela 1 – Caracterização de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol) obtidos de tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) e pertencentes à coleção de fungos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças. A caracterização de isolados foi conduzida analisando os seguintes aspectos: (1) capacidade de infecção de um conjunto de acessos diferenciais para raças fisiológicas de Fol após inoculações controladas; (2) padrão de amplicons usando o sistema de marcadores moleculares desenvolvido por Hirano & Arie (2006); (3) padrão de amplicons utilizando um sistema de marcadores para sete genes da série <i>SIX</i> (<i>secreted in xylem</i>) e (4) análise do padrão de um amplicon RAPD polimórfico (OP-Z4; identificado entre bulks de raças de Fol) que foi convertido para um marcador do sistema SCAR (R2BR)	56
---	----

Tabela 2 – Relação gene-a-gene entre raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e genótipos de tomateiro e do acesso da espécie selvagem <i>Solanum pennellii</i> ‘LA 716’)	60
--	----

Tabela 3 – <i>Primers</i> específicos utilizados para identificação e caracterização molecular de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	60
--	----

Tabela 4 – <i>Primers</i> RAPD polimórficos entre isolados das três raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	61
---	----

CAPÍTULO 3: Busca via <i>bulked segregant analysis</i> de marcadores ligados a fatores de resistência ao <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 1 (gene <i>I</i>) e raça 3 (gene <i>I-7</i>) ..	66
--	----

Tabela 1 – Características e peculiaridades dos diferentes fatores de resistência identificados contra patógenos pertencentes ao grupo <i>Fusarium oxysporum</i> em <i>Solanum</i> (sect. <i>Lycopersicon</i>)	82
--	----

Tabela 2 – Análise genética de populações F ₂ obtidas de cruzamentos entre genótipos de tomateiro suscetível (‘Ponderosa’) e resistentes (‘Viradoro’ e ‘LAM 205’) após inoculação com duas raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	83
---	----

Tabela 3 – <i>Primers</i> RAPD que se mostram polimórficos entre os genótipos ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> – Fol), ‘Viradoro’ (resistente a isolados de Fol raça 1 devido a presença do gene <i>I</i>) e LAM 205 (resistente a isolados de Fol raça 3 devido a presença do gene <i>I-7</i>)	84
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura	1
Figura 1 – Sintomas de murcha de fusário em tomateiro. A – amarelecimento e morte de folíolos; B – amarelecimento e murcha da planta; C e D – escurecimento vascular	22
Figura 2 – Aspectos morfológicos de <i>Fusarium oxysporum</i> . A e B: colônias apresentando coloração pigmentada; C – macro e microconídios; D – clamidósporos	22
 CAPÍTULO 2: Diversidade de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> associados com o cultivo do tomateiro no Brasil	 23
 Figura 1 – Reação de genótipos de tomateiro ao isolado da raça 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> coletado em Coimbra–MG (Fus 256). Plantas mortas de Ponderosa, Viradoro e Floradade (suscetíveis a raça 3) e plantas assintomáticas de BHRS-2,3 (resistente as 3 raças de Fol). A última linha é constituída por plantas não inoculadas (controles negativos)	 62
Figura 2 – Distribuição geográfica dos isolados das três raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> obtidos em diferentes regiões produtoras de tomate no Brasil	62
Figura 3 – Padrão de amplicons de isolados brasileiros de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol) para o conjunto de <i>primers</i> Uni, Sp13, Sp23 e Sp1 (primeira, segunda, terceira e quarta linha de corrida para cada isolado, respectivamente). O protocolo de PCR foi idêntico ao descrito por Hirano & Arie (2006). A figura ilustra o perfil de amplicons obtido para os isolados Fus 26 (Fol raça 2), Fus 27 (Fol raça 1), Fus 28 (Fol raça 2); Fus 23 (Fol raça 2), Fus 87 (Fol raça 2), Fus 179 (Fol raça 3); Fus 189 e Fus 190 (dois presumíveis isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>). M = Marcador 1 Kb Plus	63
Figura 4 – (A) Padrão de amplicon (aproximadamente 947 bp) positivo para o <i>primer</i> Sp1 observado para os isolados 63k e 66k (isolados referência de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> – Forl) e para os isolados Fus189, Fus 190 e Fus 289 (presumíveis isolados brasileiros de Forl). M = Marcador 1Kb Plus. (B) Sintoma de podridão de colo e escurecimento radicular induzido por Forl (Foto: D Blancard – INRA)	63
Figura 5 - Géis de agarose (1,5%) ilustrando os padrões de amplicons obtidos via <i>primers</i> RAPD com os <i>bulks</i> de DNA genômico correspondendo a uma mescla de isolados das três raças <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol) e de presumíveis isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> (Forl). As colunas representam os <i>bulks</i> formados por DNA genômico extraído de isolados das diferentes raças de Fol: R1 = <i>bulk</i> de isolados da raça 1; R2 = <i>bulk</i> de isolados da raça 2; R3 = <i>bulk</i> de isolados da raça 3; e RL = <i>bulk</i> de presumíveis isolados de Forl. Cada grupo de quatro linhas de corrida (de R1 até RL) representa o resultado obtido com um dado <i>primer</i> . M = Marcador molecular 1 Kb Plus. Os círculos em vermelho indicam alguns dos polimorfismos visualizados nessa análise	64

Figura 6 – Resultado de Blastx do alinhamento do polipeptídeo traduzido da região amplificada pelo RAPD/SCAR OP-Z4 (denominado como **R2BR**) que apresentou elevados níveis de identidade com uma região do genoma de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* contendo fatores do tipo "MFS" (GenBank EWZ7762). A região MSF ou “Major Facilitator Superfamily” é uma grande família gênica e de ampla ocorrência taxonômica que codifica proteínas que facilitam o transporte entre membranas internas no citoplasma de íons, açúcares, fosfatos, drogas, neurotransmissores, nucleosídeos, aminoácidos e peptídeos (Ma *et al.*, 2010) 65

CAPÍTULO 3: Busca via *bulked segregant analysis* de marcadores ligados a fatores de resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1 (gene *I*) e raça 3 (gene *I-7*) 66

Figura 1 – A estratégia empregada para identificação de marcadores moleculares ligados aos fatores *I* e *I-7* foi a combinação do sistema de mardores RAPD com o sistema de ‘*Bulked segregant analysis*’ (BSA) proposto por Michelmore *et al.* (1991) Nessa estratégia o DNA genômico é extraído dos genótipos parentais e uma mescla equimolar de DNA genômico extraído de um grupo seletor de indivíduos F₂ resistentes (= *bulk R*) e de indivíduos F₂ suscetíveis (= *bulk S*). Esse trabalho foi conduzido via análise por mapeamento genético usando populações segregantes para os dois genes e distintos sistemas de marcadores moleculares (Esquema modificado de Michelmore *et al.*, 1991) 85

Figura 2 – Amostra de um painel de *primers* RAPD que identificaram polimorfismos (indicados por setas vermelhas) entre os três parentais contrastantes para resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – Fol. As duas primeiras linhas de corrida (para cada *primer*) correspondem ao perfil de amplicons da variedade ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de Fol), as duas centrais correspondem ao perfil de amplicons da cultivar ‘Viradoro’ (resistente a isolados de Fol raça 1 devido a presença do gene *I*) e os duas últimos correspondem a linhagem ‘LAM 205’ (resistente a isolados de Fol raça 3 devido a presença do gene *I-7*) 86

Figura 3 - *Primers* RAPD (OPM-18, OPQ-15, OPW6, OPW7) avaliados nas populações segregantes para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) raça 1. Primeira linha de corrida = padrão de amplicons para o parental suscetível (S) ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de Fol); seguido de conjunto de sete plantas F₂ suscetíveis componentes do *bulk S* (assinalados pela chave S); conjunto de sete plantas F₂ resistentes componentes do *bulk R* (assinalados pela chave R) e última coluna parental resistente (R) 87

Figura 4 – Polimorfismo do tipo codominante encontrado entre conjunto de plantas F₂, suscetíveis (assinalados pela chave BS) e resistentes (assinalados pela chave BR) a murcha de fusário, e os genótipos ‘Ponderosa’ (S) e ‘Viradoro’ (R), utilizando o primer OPR-4 88

CAPÍTULO 4: Busca por marcadores moleculares e genes candidatos associados com a região genômica do cromossomo 11 do tomateiro contendo o gene <i>I</i> de resistência a isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 1	89
--	----

Figura 1 – Produtos de PCR utilizando o *primer* At2 observados em gel de agarose. Pond: Ponderosa; Vir: Viradoro; F1. M – Marcador molecular. Embora seja muito pequena é possível observar a diferença entre os genótipos Ponderosa e os demais

111

Figura 2 –Página da plataforma Tomatogenome.net, mostrando a comparação entre o genoma dos genótipos MoneyMaker (suscetível), Heinz (resistente) e *S. pimpinellifolium* (resistente). Os pontos em vermelho e azul representam polimorfismos quando comparados com o genoma de referência. Observar que nesta região existem vários polimorfismos em ‘Heinz’ e *S. pimpinellifolium*, mas nenhum polimorfismo em MoneyMaker

112

Figura 3 – Mapa físico da região do cromossomo 11 que contém os marcadores ligados a resistência a raça 1 de Fol e marcadores Solcaps polimórficos entre os genótipos Ponderosa (suscetível a todas as raças de Fol) e Viradoro (resistente a raça 1 de Fol). A posição de cada marcador no cromossomo está descrita de acordo com as anotações do genoma de referência do tomateiro no SolGenomics

113

Figura 4 – Curvas de Melting obtidas durante o PCR em tempo real. As curvas servem de referência para a genotipagem da população F₂, que é feita por comparação. As cores diferentes das curvas representam os parentais e a F1

114

Figura 5 – Localização dos *primers* desenhados para o gene candidato. Observar que os primers cobrem uma região de aproximadamente 700 bases na posição 5’ e mais 2000 bases na posição 3’

115

Figura 6 – Ilustração de um segmento do eletroferograma (entre os nucleotídeos 270 e 350) dos *contigs* das linhagens contrastantes ‘Viradoro’ (resistente a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* – Fol raça 1 devido a presença do gene *I*; **parte superior da figura**) ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de Fol, **parte inferior da figura**) para um gene do tipo NBS-LRR candidato (Solyc 010160.1.1.), ligados ao fenótipo de resistência no topo do cromossomo 11 do tomateiro. Observar que os acessos são idênticos, encontrado ao longo de toda a sequência (aproximadamente 7500 bases), indicando a ausência de polimorfismos (InDels ou SNPs) neste gene bem como nas regiões adjacentes

116

Figura 7 - Ilustração de um segmento do eletroferograma (entre os nucleotídeos 270 e 350) dos *contigs* das linhagens contrastantes ‘Viradoro’ (resistente a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* – Fol raça 1 devido a presença do gene *I*; parte superior da figura) ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de Fol, parte inferior da figura) para um gene do tipo NBS-LRR candidato (Solyc 010160.1.1.), ligados ao fenótipo de resistência no topo do cromossomo 11 do tomateiro. Observar que os acessos são idênticos, encontrado ao longo de toda a sequência (aproximadamente 7500 bases), indicando a ausência de polimorfismos (InDels ou SNPs) neste gene bem como nas regiões adjacentes

117

RESUMO GERAL

GONÇALVES, Amanda de Melo. Diversidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro. 2015. 121p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil. A cultura pode ser afetada por diversas doenças, dentre elas destaca-se a murcha de fusário, que já foi relatada na maioria dos países onde o tomateiro é cultivado. O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) infecta tanto espécies cultivadas como espécies selvagens de tomateiro, onde coloniza as raízes e invade o sistema vascular, causando amarelecimento, murcha e posterior morte da planta. Três fatores de resistência têm sido identificados e caracterizados em espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*) e incorporados em cultivares e híbridos comerciais. Os isolados de Fol têm sido agrupados em três raças, de acordo com a habilidade de infectar e causar doença em um conjunto de acessos diferenciadores contendo os loci de resistência *I*, *I-2* e *I-3*. A identificação e caracterização genética de novas fontes e de novos alelos de resistência, bem como o estabelecimento de uma plataforma de seleção assistida por marcadores desses fatores já caracterizados, seriam importantes contribuições no sentido de aumentar a eficiência dos programas de melhoramento, permitindo, inclusive, que os melhoristas antecipem potenciais problemas relacionados ao surgimento de novas raças de Fol. Um dos principais objetivos dos modernos programas de melhoramento para resistência a doenças é o estabelecimento de sistemas de marcadores moleculares para caracterizar tanto a diversidade dos patógenos como para identificar regiões genômicas contendo alelos de resistência na planta hospedeira. Essas ferramentas moleculares fornecem uma visão mais completa do patossistema de interesse para o melhorista uma vez que possibilitam: **(1)** a caracterização em larga escala de um grande número de genótipos do patógeno e de genitores contrastantes da planta hospedeira; **(2)** a seleção de isolados representativos do patógeno para uso em sistemas efetivos de seleção e **(3)** a identificação de genes ou regiões genômicas da planta hospedeira contendo fatores de resistência. Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram: estudar a diversidade genética-molecular de isolados das três raças de Fol e buscar marcadores moleculares do tipo raça-específicos (**Capítulo 2**). Nesse trabalho, uma coleção de isolados de Fol foi caracterizada utilizando uma combinação de *primers* do tipo raça-específicos descritos na literatura com sendo capazes de discriminar isolados das três raças de Fol e também isolados

F. oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici*. A diversidade entre as raças foi avaliada utilizando *primers* universais buscando polimorfismos que serviram de base para o desenho de novos *primers* raça-específicos. Estes estudos são de grande valor no diagnóstico e na identificação de diferentes isolados de forma rápida e eficaz. Outro objetivo foi a caracterização genética de populações segregantes obtidas a partir de cruzamentos entre genótipos suscetíveis e resistentes às diferentes raças, visando identificar e validar novos marcadores associados a resistência a murcha de fusário em tomateiro (**Capítulos 3 e 4**). Para isso, as populações F₂ foram inoculadas, com uma suspensão de esporos do patógeno, por meio de corte e imersão de raízes, e avaliadas quanto à resistência por meio de uma escala de notas. O DNA genômico de plantas resistentes e suscetíveis em populações segregantes para as raças 1 e 3 de Fol foi extraído e usado como molde em diferentes sistemas de marcadores, visando identificar polimorfismos ligados as essas duas características em estudo. Além disso, *primers* já descritos foram avaliados nas populações segregantes, para validar sua ligação aos loci de resistência. Esse aporte de informações de genômica e bioinformática tem aumentado a eficiência e oferecido uma maior segurança no processo de seleção de plantas superiores dentro dos programas de melhoramento.

Palavras-chave: murcha de fusário; *Solanum lycopersicum*; Fol.

Comitê de orientação: Leonardo Silva Boiteux – Embrapa Hortaliças (Orientador); Ailton Reis – Embrapa Hortaliças (Co-orientador)

GENERAL ABSTRACT

GONÇALVES, Amanda de Melo. Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and development and validation of molecular markers related to resistance genes in tomato. 2015. 121pp. Thesis (Doctorate in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the main vegetable crops grown in Brazil, being affected by a variety of diseases under open field and protected crop conditions. Fusarium wilt has been reported in most countries where tomatoes are cultivated. The causal agent is the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), which is able to infect both cultivated and wild tomato species. This fungus colonizes the roots and invades the vascular system, causing yellowing, wilting, and plant death. Three resistance loci (*I*, *I-2* and *I-3*) have been characterized in wild species of *Solanum* (section *Lycopersicon*) and incorporated into commercial cultivars. The Fol strains have been grouped into three races, according to their ability to infect and cause disease in a set of differential accessions carrying one of these three resistance loci. Identification and genetic characterization of new resistance alleles and the establishment of a marker-assisted selection platform of the already known alleles can increase the efficiency of breeding programs, allowing the breeders to anticipate potential problems related to the emergence of new races of Fol. A major objective of breeding programs is the identification of molecular markers linked to resistance alleles that allow the characterization of a large number of genotypes, selection of parental inbred lines and detection of genes of agronomic interest. Thus, the objectives of the present study were to survey the diversity of a collection of Fol races and the search for Fol race-specific molecular markers (**Chapter 2**). The collection of Fol isolates was characterized using race-specific primers previously reported in the literature. These primers can separate the three races of Fol as well as isolates belonging to *F. oxysporum* sp. *radicis-lycopersici*. However, this distinction has only been possible by the combination of marker systems. In this context, the diversity among races was evaluated using universal primers looking for polymorphisms that were the basis for the design of new race-specific primers. These studies are of great value in the diagnosis and identification of different strains quickly and effectively. Another objective was the genetic characterization of segregating populations obtained from crosses between genotypes susceptible and resistant to different races, aiming to validate and identify new markers associated with resistance to fusarium wilt in tomato, (**Chapters 3 and 4**). For this reason, distinct F₂ populations were inoculated with a suspension of spores of the pathogen via root dipping method and evaluated using a disease severity scale. The resistant and susceptible plants were evaluated in the search for

polymorphisms to be used in the design of markers linked to resistance factors to Fol race 1 (gene *I*) and Fol race 3 (gene *I-7*). In addition, primers previously described were evaluated in the segregating populations to validate their linkage with these resistance loci. This genomic information and bioinformatics will be important contribution aiming to increase the selection efficiency multi-race resistance plants within the breeding programs.

Keywords: fusarium wilt; *Solanum lycopersicum*; Fol.

Guidance Committee: Leonardo Silva Boiteux – Embrapa Vegetables, (Advisor), Ailton Reis - Embrapa Vegetables (Co-Advisor)

Capítulo 1

REVISÃO DE LITERATURA

REFERÊNCIAL TEÓRICO

A cultura do tomateiro – O tomateiro é uma das hortaliças mais conhecidas e de maior consumo no mundo. O centro de origem da espécie domesticada (*Solanum lycopersicum* L.) e de algumas espécies silvestres é a região Ocidental da América do Sul, englobando as encostas dos Andes e faixa litorânea do Chile, Peru, Bolívia, Equador e Ilhas Galápagos. No entanto, o México é considerado o mais provável centro de domesticação (Maranca, 1986). O tomateiro é uma planta pertencente à ordem Tubiflorae, gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*) da família *Solanaceae*. A primeira denominação científica do tomateiro foi dada em 1694 classificando-o dentro do gênero *Lycopersicon*. Linnaeus (1753) reclassificou o tomateiro como sendo um membro do gênero *Solanum*. O botânico Miller (1754), por sua vez, sugeriu a mudança para o gênero *Lycopersicon* descrevendo várias espécies (incluindo o tomate cultivado) o qual denominou *L. esculentum* Mill. Somente após várias análises envolvendo a combinação de caracteres morfológicos e moleculares da família *Solanaceae* foi possível definir o reposicionamento taxonômico do tomateiro, retornando a classificação proposta por Linnaeus (1753) para o gênero *Solanum* (Caicedo & Peralta, 2006; Liedl *et al.*, 2012). Essa nova classificação é atualmente aceita pela maioria dos taxonomistas. O grupo de plantas do gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*) consiste de 13 espécies ou subespécies, altamente relacionadas: o tomate cultivado (*S. lycopersicum*) e as espécies silvestres *S. arcanum*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. corneliomulleri*, *S. galapagnese*, *S. habrochaites*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S. pennellii*, *S. peruvianum* e *S. pimpinellifolium* (Peralta *et al.*, 2006).

O tomateiro é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, sendo a primeira em produção e a segunda em área plantada (FAOSTAT, 2013). O cultivo do tomate destina-se basicamente a duas cadeias agroalimentares: a indústria de processamento e o consumo *in natura*. No ponto de vista global, a cultura do tomate é a oitava mais importante com uma produção em torno de 159 milhões de toneladas (MT). No Brasil, o cultivo do tomateiro foi

introduzido no final do século XVIII e tornou-se a segunda hortaliça em importância socioeconômica, sendo cultivada na maioria dos Estados brasileiros (Silva, 1993). Atualmente, o Brasil é oitavo país no mundo em produção de tomate, com uma contribuição anual em torno de 4,4 MT. Essas cifras representam uma participação de aproximadamente 3% no total mundial, ficando atrás de países como China, Índia e Estados Unidos (FAOSTAT, 2013). A produção da região Sudeste é a mais expressiva, sendo responsável por aproximadamente 39,1% do total nacional. Em termos de produção total (tomate para processamento + tomate para consumo *in natura*), o Estado de Goiás é o maior produtor brasileiro, com 1.230.512 toneladas, ou 32,1% do total, seguido por São Paulo com 17,6%, Minas Gerais com 13,5%, Paraná com 7,3%, Bahia com 5,1% e Rio de Janeiro com 4,7% (IBGE, 2013). Atualmente a produção de tomate para processamento industrial está restrita praticamente ao Estado de Goiás (86%), com pequena participação do Estado de São Paulo (12,7%) e Minas Gerais (1,3%) (Vilela *et al.*, 2012). O tomateiro é uma espécie muito sensível ao clima, sendo que sua oferta é ajustada à demanda, já que é um produto basicamente destinado ao consumo interno. Dessa forma, quaisquer problemas climáticos ou bióticos nas zonas produtoras desencadeiam grandes variações nos preços de comercialização. Por sua vez, o aumento do preço do produto estimula novos plantios e, conseqüentemente, o aumento da produção regulariza o mercado, fazendo os preços voltarem aos patamares anteriores (IBGE, 2013).

O tomateiro pode ser afetado por diversos problemas bióticos e abióticos, tendo sido relatados cerca de duzentas doenças e distúrbios fisiológicos, provocando redução significativa de produtividade e qualidade do produto comercial em diferentes regiões produtoras do mundo (Lopes *et al.*, 2005; Reis & Lopes, 2012). Os problemas fitossanitários são os principais obstáculos para a cultura do tomate, podendo limitar seu cultivo em algumas épocas e/ou regiões do País, pela falta de métodos de controle eficazes ou pela proibitiva elevação do custo de produção. Dentre esses problemas destaca-se a murcha de fusário, doença presente na

maioria dos países onde o tomateiro é cultivado (Kurozawa & Pavan, 2005).

A murcha de fússario do tomateiro – A murcha de fusário [causada por diferentes raças do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)] é uma das doenças mais importantes do tomateiro, muito destrutiva e de ocorrência generalizada. É uma doença radicular, favorecida por temperatura alta e solos arenosos e/ou ácidos. O patógeno dissemina-se a curtas distâncias por meio de mudas infectadas, de implementos agrícolas e da água de irrigação. No entanto, o modo mais eficiente de disseminação a longas distâncias é a transmissão por sementes contaminadas (Lopes *et al.*, 2005; Reis & Lopes, 2012). O patógeno penetra através de ferimentos nas raízes e causa amarelecimento, murcha (**Figuras 1A e 1B**) e posterior morte da planta (Kuramae & Souza, 2008). Os sintomas na parte aérea se manifestam primeiramente nas folhas mais velhas, progredindo para as folhas mais novas. Quando o caule é cortado no sentido longitudinal, observa-se uma coloração marrom intensa logo abaixo da casca (**Figuras 1C e 1D**). O escurecimento dos vasos é característico desta doença e auxilia na sua identificação. É comum a presença da chamada “murcha hemisférica”, que ocorre apenas em um lado da planta ou em um lado da folha (**Figura 1A**). O fungo penetra o tecido e atinge os vasos do xilema, onde se multiplica, interferindo no processo de translocação de água desde as raízes até as folhas. Essa doença tem gerado grande preocupação aos produtores brasileiros devido ao seu potencial destrutivo uma vez que ela pode dizimar até 100% do campo quando as condições são favoráveis ao patógeno. A condução de trabalhos de levantamento bastante criteriosos e abrangentes se fazem necessários nas principais regiões produtoras de tomate do Brasil para a obtenção de informações realistas sobre a ocorrência e distribuição geográfica desta doença no Brasil. O controle dessa doença é muito difícil, uma vez que os métodos culturais e químicos são pouco eficientes e acarretam aumento considerável nos custos de produção. A única medida segura e eficiente de controle tem sido o emprego de variedades e híbridos resistentes

(Kurozawa & Pavan, 2005). Variedades que combinem os distintos genes de resistência têm sido desenvolvidas e introduzidas na produção comercial para proteger ainda mais a cultura do tomate contra a murcha de fusário. É indispensável conhecer bem todos os fatores envolvidos no estabelecimento da doença e as técnicas de manejo, de modo a prevenir ou retardar epidemias, assim como o surgimento de novas raças do patógeno.

Agente Causal – *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – *Fusarium oxysporum* é um fungo cosmopolita, de importância mundial, com ampla gama de hospedeiros e distribuição em todas as regiões produtoras. É um patógeno de solo e sobrevive nesse ambiente por períodos acima de sete anos, principalmente por meio de clamidósporos, que são as estruturas de resistência do fungo. A morfologia da colônia em batata-dextrose-agar (BDA) é muito variável e se caracteriza pelo crescimento rápido. As colônias podem apresentar coloração pálida até pigmentada, variando de violeta à púrpura escuro ou creme à laranja (**Figuras 2A e 2B**), com micélio aéreo e difuso. O fungo produz macro e microconídios (**Figura 2C**) e alguns isolados produzem clamidósporos abundantemente (**Figura 2D**). Devido à plasticidade fenotípica e às variações nas características morfológicas e patogênicas, uma classificação complexa dividida em seções foi proposta para o gênero, assim como *formae speciales* e raças (Leslie & Summerell, 2006). O conceito *forma specialis* foi ampliado por Snyder & Hansen (1953) para reconhecer isolados patogênicos morfológicamente semelhantes a isolados saprofíticos da mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar uma gama específica de hospedeiros. A determinação da *forma specialis* é feita por meio de testes de patogenicidade em várias espécies de plantas, enquanto as raças são determinadas por ensaios de virulência em diferentes cultivares e/ou acessos de uma única espécie botânica ou, às vezes, em acessos de espécies correlatas à hospedeira original. Embora esses bioensaios sejam muito eficazes, são demorados e trabalhosos (Lievens *et al.*, 2008). Assim, devido a todas essas limitações

específicas, estas técnicas estão sendo cada vez mais complementadas ou integralmente substituídas. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, infecta tanto espécies cultivadas como espécies selvagens de tomateiro. Foram descritas, até o presente momento, três raças do patógeno, denominadas 1, 2 e 3 (sinonímia: 0, 1 e 2 – Gabe, 1975) definidas de acordo com a habilidade de infecção em diferentes acessos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* portadores de diferentes genes/fatores de resistência da série *I* (= *Immunity*) (Reis *et al.*, 2005). Até o presente momento, três fatores de resistência raça-específicos (*I*, *I-2* e *I-3*) foram geneticamente caracterizados em espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*) e introgridos em variedades comerciais (Huang & Lindhout 1997; Hemming *et al.*, 2004).

Durante o processo de colonização dos vasos de xilema, o Fol é capaz de secretar enzimas e outras proteínas dentro da planta hospedeira. Estas proteínas codificam funções que promovem a colonização do hospedeiro, por exemplo, pela supressão dos mecanismos basais de defesa (Rep *et al.*, 2004). É esse repertório de proteínas efetoras que determina a virulência de um patógeno a um hospedeiro particular. Houterman *et al.* (2007) identificaram 33 diferentes proteínas na composição do proteoma da seiva do xilema de plantas infectadas com Fol, dentre elas foi possível identificar sete proteínas como sendo de origem fúngica e 13 como específicas de plantas infectadas.

Atualmente onze proteínas de Fol já foram identificadas no xilema das plantas hospedeiras, as quais são genericamente denominadas como proteínas secretadas no xilema (sigla em inglês *SIX* = ‘*secreted in xylem*’). Três destas proteínas são bloqueadas pelos genes da série *I* (= *Immunity*) do tomateiro: *Avr1* (= *SIX4*) é reconhecida pelos genes não alélicos *I* e *I-1*; *Avr2* (= *SIX3*) é reconhecida pelo gene *I-2*; e *Avr3* (= *SIX1*) é reconhecido pelo gene *I-3*. Os fatores *Avr2*, *Avr3* assim como *SIX6*, são efetores genuínos e estão envolvidos com a virulência geral (Houterman *et al.*, 2008; 2009; Lievens *et al.*, 2009; González *et al.*, 2012).

As proteínas secretadas podem desempenhar função de virulência ou avirulência.

Formae speciales de *F. oxysporum* têm preferência por hospedeiros específicos, mas os papéis das proteínas SIX em diversos hospedeiros são desconhecidos. (Thatcher *et al.*, 2012). *SIX4* secretada por Fol atua na especificidade de hospedeiros tanto como proteína de avirulência, quanto como supressor de outras resistências raça-específicas. O gene *Avr1* foi encontrado burlando a resistência a doença mediada por *I-2* e *I-3* (Houterman *et al.*, 2008), explicando observações anteriores de que isolados da raça 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, podem causar doença em linhagens de tomates contendo os genes *I-2* ou *I-3*, mas não *I* ou *I-1* (Mes *et al.*, 1999; Rep. *et al.*, 2005; Michielse & Rep, 2009). *SIX3* (renomeado *Avr2*) contribui na virulência e é reconhecida pelo produto do gene *I-2* no núcleo (Houterman *et al.*, 2009; Wit *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013).

Muitas ferramentas moleculares vêm sendo utilizadas para a caracterização e diferenciação de isolados de *F. oxysporum* obtidos em associação com o tomateiro (Matsumoto, 2006). A genômica comparativa aumenta consideravelmente a taxa de descoberta de genes que determinam o padrão de patogenicidade fúngica. Uma importante descoberta foi que a maior parte dos diferentes genes encontrados entre isolados do mesmo gênero (ou até mesmo da mesma espécie) parecem estar envolvidos na adaptação ao nicho, incluindo a colonização de tecido vivo da planta. Estes genes ou conjuntos gênicos não estão geralmente dispersos aleatoriamente no genoma, mas sim tendem a concentrarem-se em *clusters* (ilhas), regiões telomero-proximais ou mesmo espalhadas por todo um cromossomo do tipo linhagem-específico (Rep & Kistler, 2010).

Já estão descritos vários genes de Fol que conferem capacidade de causar doenças em tomate. Além disso, é necessária a presença contínua de células vivas do hospedeiro para a expressão dos genes de avirulência (van de Does *et al.*, 2008b). Análises de isolados de *F. oxysporum* revelaram regiões genômicas linhagem-específicas, as quais incluem quatro cromossomos inteiros e representam mais de um quarto do genoma do fungo. Essas regiões são

ricas em transposons e genes com diferentes taxas de evolução, mas que são todos relacionados com a patogenicidade, indicando uma potencial aquisição horizontal desses fatores. A mobilização desses cromossomos pode, em um único evento, transferir um conjunto completo de genes necessários à compatibilidade de uma nova linhagem genética (Ma *et al.*, 2010).

Um pequeno cromossomo (≈ 2.0 Mb), designado cromossomo 14 (Ch 14), foi recentemente detectado em Fol e encontrado contendo conjuntos de genes efetores, como os *SIX1*, *SIX3*, *SIX4* e outros genes presumivelmente relacionados com a patogenicidade. Isolados de Fol pertencentes a clados filogeneticamente distintos compartilham esses grupos de genes sugerindo uma potencial origem polifilética de Fol (Inami *et al.*, 2014).

O mecanismo detalhado que regula a transferência horizontal de genes em fungos é ainda obscuro. No entanto, o conhecimento dos mecanismos subjacentes a este rápido padrão de adaptação do patógeno a novas hospedeiras terá importante impacto no desenvolvimento de estratégias para manejo da doença causada por esse grupo de fungos em sistemas agrícolas (Ma *et al.*, 2010).

Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici – O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) é outro importante patógeno do tomateiro, especialmente em condições de temperaturas mais amenas. Forl é capaz de infectar várias espécies e variedades de plantas pertencentes às famílias Solanaceae, Leguminosae, Cucurbitaceae e Chenopodiaceae (Jarvis & Shoemaker, 1978; Rowe, 1980; Çolak & Biçici, 2013). O patógeno causa podridão de raiz e coroa e é favorecido por baixas temperaturas, geralmente entre 10° e 20°C, ótimo de 18°C. Baixo pH do solo e alta umidade também podem contribuir com o aumento da doença (Zhang *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001). Os primeiros sintomas incluem nanismo, amarelecimento e queda prematura de folhas baixas. Este patógeno é responsável por quedas de produção no campo e em estufas comerciais (Jones *et al.*, 1991; Jacobs & van Heerden, 2012). O controle tem sido

feito pela combinação do uso de fungicidas e controle biológico e tem se mostrado bastante positivo para a redução da doença no campo. No entanto, a utilização de cultivares que tenham resistência a este patógeno, ainda é a melhor alternativa de controle da doença (Szczechura *et al.*, 2013). A resistência a Forl foi introduzida no tomateiro cultivado a partir de acessos de *S. peruvianum* (Fazio *et al.*, 1999). Este gene de resistência foi denominado *Frl* e está fortemente ligado ao *Tm-2* de resistência ao *Tobacco mosaic virus* no cromossomo 9 do tomateiro (Elkind *et al.*, 1988).

Marcadores moleculares e aplicações no melhoramento genético do tomateiro – O advento de técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) representou uma poderosa opção para a identificação de polimorfismos genéticos e sua conversão para marcadores moleculares associados com características (fenótipos) de interesse. A técnica de PCR, que foi desenvolvida em meados da década de 1980, envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias idênticas de um segmento específico de DNA (White *et al.*, 1989). O sistema de marcadores RAPD (“*Randomly Amplified Polymorphic DNA*”) é uma técnica baseada em PCR e que apresenta como característica a utilização na reação de amplificação de *primers* mais curtos e de sequência arbitrária. Esse é um sistema robusto que elimina a necessidade de um conhecimento prévio da sequência ou do segmento genômico a ser amplificado. O sistema RAPD tem sido empregado para distinguir linhagens contrastantes (ex. resistentes vs. suscetíveis), gerando um padrão de bandas (= amplicons) específico para cada fenótipo. De fato, o sistema RAPD tem se mostrado uma boa técnica para a obtenção de marcadores moleculares ligados a fatores de resistência a doenças (Karnopp, 2003). O emprego de marcadores moleculares nas diferentes etapas do processo de melhoramento genético pode simplificar os sistemas de seleção, com o aumento da escala de seleção e a diminuição do tempo de obtenção dos resultados (Lievens *et al.*, 2008).

Os marcadores moleculares podem também contribuir para incrementar a eficiência do melhoramento de plantas através do mapeamento de fatores genéticos de interesse ligados ou associados a importantes caracteres agrônômicos (Bered *et al.*, 1997; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Para ser útil, um marcador molecular deve ser capaz de diferenciar os progenitores contrastantes para uma dada característica e deve ser reproduzido com precisão na progênie segregante. Esse marcador pode ter uma estreita ligação com o caráter desejado, ou ainda melhor, estar inserido dentro do gene que condiciona um dado caráter de interesse (= marcador funcional). Entre as aplicações práticas dos marcadores encontram-se a escolha de progenitores para o melhoramento, a seleção indireta de plantas e a clonagem de genes (Vieira *et al.*, 2006).

Inúmeros marcadores moleculares têm sido identificados e mapeados no genoma do tomateiro. A identificação de marcadores de DNA fortemente ligados a uma característica de interesse facilita significativamente a escolha de materiais desejáveis aos programas de melhoramento. Esta seleção amparada por marcadores moleculares tem sido denominada pelas siglas **MAS** (do inglês *Marker Assisted Selection*) ou **SAM** (*Seleção Assistida por Marcadores*). À medida que os custos de implementação vêm apresentando valores decrescentes, este tipo de seleção está sendo cada vez mais utilizada nos programas de melhoramento do tomateiro, contribuindo para o monitoramento de genes maiores (qualitativos) ou de características poligênicas (= *Quantitative trait loci* – QTL) e sua transferência de espécies silvestres para espécies cultivadas (Foolad, 2007).

O projeto SOLGenomics (*The International Solanaceae Genome Project*) é uma importante iniciativa da comunidade de pesquisadores que trabalham com de análise de genomas da família Solanaceae. Esta plataforma foi estabelecida para criar uma rede de trabalho/colaboração científica e coordenar pesquisas realizadas por diferentes grupos de cientistas de todo o mundo trabalhando nesse tema. O SOLGenomics é uma base de dados na internet SGN (*Solanaceae Genomics Network*) desenhado para integrar informações sobre o

genoma do tomateiro e posteriormente todas as espécies da família Solanaceae (Mueller *et al.*, 2005, Barone *et al.*, 2009).

Os programas de melhoramento de tomateiro têm historicamente trabalhado com a introgressão de genes a partir de espécies silvestres (Boiteux *et al.*, 2012), principalmente aqueles relacionados a resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos. Recentemente, análises moleculares da estrutura genética de um conjunto de acessos silvestres de *S. pimpinellifolium* e de acessos cultivados mostraram que tomates domesticados e silvestres evoluíram como um complexo de espécies com intensa hibridização e troca de segmentos genômicos (Zuriaga *et al.*, 2009; Bauchet & Causse, 2012). A variação interespecífica e a ausência de barreiras de cruzamento entre *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* indicam uma estreita relação filogenética entre as duas espécies e mostra que *S. pimpinellifolium* tem sido uma fonte significativa de fatores genéticos para muitas características comercialmente importantes para o tomateiro cultivado (Zuriaga *et al.*, 2009b).

Três fatores foram identificados e geneticamente caracterizados para resistência a Fol: o gene *I* (que confere resistência exclusiva a isolados da raça 1) foi introgridido de acessos de *S. pimpinellifolium* e o gene *I-2* (que confere resistência a isolados da raça 2 e possivelmente também para isolados da raça 1) foi também introgridido de um acesso *S. pimpinellifolium* (denominado 'PI-126915'). Por sua vez, o gene *I-3* (que confere resistência a isolados da raça 3, embora existam indicações que esse fator possa controlar resistência a isolados de todas as três raças) foi introgridido do acesso 'LA-716' da espécie selvagem *S. pennellii* (Takken & Rep, 2010). Outro gene que confere resistência a isolados da raça 3 foi denominado de *I-7*, foi introgridido a partir do acesso de *S. pennellii* 'PI-414773' (Lim *et al.*, 2006). Até recentemente, o gene *I-2* era o único gene associado com resistência a Fol a ser isolado e clonado (Simons *et al.*, 1998). Mais recentemente, um grupo de pesquisa da Austrália conseguiu, aparentemente, clonar o gene *I-3* (Catanraziti *et al.*, 2015).

Mesmo com toda a informação de sequências e inúmeros marcadores identificados, até o momento ainda não existem regiões genômicas bem caracterizadas para alguns dos genes que controlam resistência a Fol. Sendo assim, são necessários esforços adicionais para refinar e validar os marcadores já existentes ou para identificar e desenvolver novos marcadores polimórficos de maior utilidade e reprodutibilidade em populações específicas (Panthee & Foolad, 2012). Nesse contexto, o escopo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade de isolados das três raças de Fol presentes no Brasil. E ainda, identificar e validar novos marcadores moleculares associados a genes/regiões genômicas associados com a resistência a Fol previamente descritos em tomateiro, permitindo estabelecer uma plataforma de seleção assistida para apoio ao melhoramento genético do tomateiro.

JUSTIFICATIVA

Um dos principais objetivos dos modernos programas de melhoramento para resistência a doenças é o estabelecimento de sistemas de marcadores moleculares para caracterizar tanto a diversidade dos patógenos como para identificar regiões genômicas contendo alelos de resistência na planta hospedeira. Essas ferramentas moleculares fornecem uma visão mais completa do patossistema de interesse para o melhorista uma vez que possibilitam: **(1)** a

caracterização em larga escala de um grande número de genótipos do patógeno e de genitores contrastantes da planta hospedeira (Bered *et al.*, 1997); (2) a seleção de isolados representativos do patógeno para uso em sistemas efetivos de *screening* de germoplasma e (3) a identificação de genes ou regiões genômicas da planta hospedeira contendo fatores de resistência (Barone, 2009). Métodos moleculares são de extremo interesse devido a maior estabilidade bem como pela facilidade de uso e de interpretação dos resultados.

Essas ferramentas são também cruciais para a diferenciação/taxonomia e catalogação da diversidade de espécies fúngicas e no processo de identificação de novos isolados de importância econômica e epidemiológica (MacCartney *et al.*, 2003). Sendo assim, o desenvolvimento de marcadores específicos para raças de Fol podem permitir: (1) otimizar o tempo de identificação das raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e (2) a seleção de isolados representativos para uso em sistema de seleção de plantas com resistência. Por sua vez, a identificação de marcadores para os fatores de resistência no tomateiro possibilitam: (1) a identificação indireta de novas fontes de genes/alelos de resistência; (2) o aumento da eficiência no monitoramento da incorporação da resistência; (3) a ‘piramidação’ de genes de interesse; e (4) que a seleção de plantas resistentes possa ser conduzida de maneira antecipatória (“*preemptive breeding*”) em sistemas de seleção conduzidos na ausência do patógeno e/ou sem necessidade de inoculação.

OBJETIVOS

GERAL

Analisar e catalogar a diversidade entre isolados das três raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* presentes no Brasil e desenvolver marcadores moleculares associados à resistência condicionada por dois fatores de resistência (*I* e *I-7*).

ESPECÍFICOS

- Analisar a diversidade entre as raças de Fol presentes no Brasil;
- Caracterizar o perfil molecular de uma coleção de isolados das três raças de Fol coletados no Brasil;
- Identificar marcadores raça-específicos para os diferentes isolados de Fol coletados no Brasil;
- Caracterizar geneticamente as populações segregantes obtidas a partir de cruzamentos entre genótipos de tomateiro contrastantes (suscetíveis e resistentes) para a presença/ausência dos fatores de resistência *I* (resistência a isolados de Fol raça 1) e *I-7* (resistência a isolados de Fol raça 3).
- Identificar marcadores associados aos fatores de resistência *I* ou *I-7* às raças 1 e 3 do patógeno, respectivamente;
- Validar marcadores já existentes ligados ao locus *I* e explorar a região do cromossomo 11 (onde esse fator de resistência está localizado) em busca de novos marcadores e/ou genes candidatos.

Nesse contexto, o escopo do trabalho foi caracterizar a diversidade dos isolados das três raças de Fol presentes no Brasil. Em adição, a caracterização genética de populações

segregantes, obtidas a partir de cruzamentos entre genótipos suscetíveis e resistentes as diferentes raças, identificação de marcadores moleculares associados a genes de resistência a Fol previamente descritos em tomateiro. O impacto esperado do presente trabalho é fornecer um panorama mais claro dos componentes bióticos do patossistema Fol-tomateiro, permitindo estabelecer uma plataforma de seleção assistida que possa apoiar de maneira efetiva, melhoramento genético do tomateiro visando o controle dessa importante enfermidade da cultura.

LITERATURA CITADA

BARONE A (2009) Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. Disponível: <http://www.fao.org/biotech/docs/Barone.pdf>

BARONE A; DI MATTEO A; CARPUTO D; FRUSCIANTE L (2008) High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency. **Current Genomics** 10: 1–9.

BAUCHET G; CAUSSE M (2012) Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Wild Relatives. In: ÇALISKAN M (Ed) Genetic Diversity in Plants. Intech: 133–162

BERED F; BARBOSA-NETO JF; CARVALHO FIF (1997) Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural** 27: 513–520.

CAICEDO A; PERALTA I (2012) Basic Information about tomatoes and the tomato group. In: LIEDL BE; LABATE JA; STOMMEL JR; SLADE A; KOLE C (eds). Genetics, Genomics and Breeding of Tomato. CRC Press. 480pp.

CATANZARITI AM; LIM GTT; JONES DA (2015) The tomato *I-3* gene: A novel gene for resistance to Fusarium wilt disease. **New Phytologist** (on line).

ÇOLAK A; BIÇICI M (2013) PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in protected tomato-growing areas of the eastern Mediterranean region of Turkey. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 37: 457–467.

ELKIND Y; KEDAR N; KATAN Y; COUTEAUDIER Y; LATERROT H (1988). Linkage between *Tm-2* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance (Forl). **Report of the Tomato Genetics Cooperative** 38: 22.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization (2013). Top production: Tomatoes, 2011.

FAZIO G; STEVENS MR; SCOTT JW (1999) Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Frl*) in tomato. **Euphytica** 105: 205–210.

FERREIRA ME; GRATTAPAGLIA D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 200pp.

FOOLAD MR (2007) Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. **International Journal of Plant Genomics**. Review Article: 52pp.

GABE HL (1975) Standardization of nomenclature for pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Transactions of the British Mycological Society** 64: 156-159.

GONZÁLEZ I; ARIAS Y; PETEIRA B (2012) Tomate. **Revista de Protección Vegetal** 27: 1–7.

HEMMING MN; BASUKI S; McGRATH DJ; CARROLL BJ; JONES DA (2004) Fine mapping of the tomato I-3 gene for *Fusarium* wilt resistance and elimination of co-segregating resistance gene analogue as a candidate for I-3. **Theoretical and Applied Genetics** 109: 409–418.

HOUTERMAN PM; SPEIJER D; DEKKER HL; KOSTER CG; CORNELISSEN BJC; REP M (2007) The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology** 8: 215–221.

HOUTERMAN PM; CORNELISSEN BJC; REP M (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. **PLoS Pathogen** 4(5): 1000061

HOUTERMAN PM; MA; VAN OOIJEN G; DE VROOMEN MJ; CORNELISSEN JC; TAKKEN FLW; REP M (2009) the effector protein *Avr2* of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein *I-2* intracellularly. **The Plant Journal** 58: 970–978.

HUANG CC; LINDHOUT P (1997) Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. **Euphytica**: 93:145–153.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro: 26(6): 1–81

INAMI K; KASHIWA T; KAWABE M; ONOKUBO-OKABE A; ISHIKAWA N; PÉREZ ER; HOZUMI T; CABALLERO LA; BALDARRAGO FC; ROCO MJ; MADADI KA; PEEVER TL; TERAOKA T; KODAMA M; ARIE T (2014) The tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* shares common ancestor with nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from wild tomato in the Peruvian Andes. **Microbes and Environments** 29: 200–210.

JACOBS A; GOVENDER R; VAN HEERDEN SW (2013) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing tomato wilt in South Africa. **Australasian Plant Disease Notes** 8: 145–147.

JARVIS WR; SHOEMAKER RA (1978) Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. **Phytopathology** 68: 1679–1680.

KARNOPP LM (2003) Marcadores moleculares e geminivirus: Identificação de marcadores moleculares em populações de tomateiro resistentes a geminivirus. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 30: 91–96.

KIM JT; PARK IH; HAHM YI; YU SH (2001) Crown and root rot of greenhouse tomato caused by *Fusarium*

oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici* in Korea. **Plant Pathology Journal** 17:290–294.

KURAMAE EE; SOUZA NL (2008) Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum** 24: 1481–1485.

KUROZAWA C; PAVAN MA (2005) Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI H; AMORIM L; REZENDE JMA; BERGAMIN FILHO A; CAMARGO LEA. (Eds). Manual de Fitopatologia. Vol 2. 4^{ed}. São Paulo: Agronômica Ceres.

LESLIE JF; SUMMERELL BA (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, 2006. 387pp.

LIEDL BE; LABATE JA; STOMMEL JR; SLADE A; KOLE C (2012) (eds) Genetics, Genomics and Breeding of Tomato. CRC Press. 480pp.

LIEVENS B; REP M; THOMA BPHJ (2008) Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. **Pest Management Science** 64: 781–788.

LIEVENS B; HOURTERMAN PM; REP M (2009) Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. **FEMS Microbiology Letters** 300:201–215.

LIM GTT; WANG G-P; HEMMING MN; BASUKI S; McGRATH DJ; CARROLL BJ; JONES DA (2006) Mapping the *I-3* gene for resistance to *Fusarium* wilt in tomato: Application of an *I-3* marker in tomato improvement and progress towards the cloning of *I-3*. **Australasian Plant Pathology** 35: 671–680.

LOPES CA; REIS A; BOITEUX LS (2005) Doenças Fúngicas. In: LOPES CA; ÁVILA AC. (Orgs). Doenças do Tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças. 151pp.

MA LJ; VAN DER DOES HC; BORKOVICH KA; COLEMAN JJ; DABOUSSI MJ; PIETRO AD; DUFRESNE M; FREITAG M; GRABHERR M; HENRISSAT B; HOUTERMAN PM; KANG S; SHIM WB; WOLOSHUK C; XIE X; XU JR; ANTONIW J; BAKER SE; BLUHM BH; BREAKSPEAR A; BROWN DW; BUTCHKO RAE; CHAPMAN S; COULSON R; COUTINHO PM; DANCHIN EGJ; DIENER A; GALE LR; GARDINER DM; GOFF S; HAMMOND-KOSACK KE; HILBURN K; HUA-VAN A; JONKERS W; KAZAN K; KODIRA CD; KOEHRSEN M; KUMAR L; LEE YH; LI L; MANNER JM; MIRANDA-SAAVEDRA D; MUKHERJEE M; PARK G; PARK J; PAR SY; PROCTOR RH; REGEV A; RUIZ-ROLDAN MC; SAIN D; SAKTHIKUMAR S; SYKES S; SCHWARTZ DC; TURGEON BG; WAPINSKI I; YODER O; YOUNG S; ZENG Q; ZHOU S; GALAGAN J; CUOMO CA; KISTLER HC; REP M (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature** 464: 367–373.

MA L; CORNELISSEN BJC; TAKKEN FLW (2013) A nuclear localization for *Avr2* from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required to activate the tomato resistance protein I-2. **Frontiers of Plant Science** 4: 94

MARANCA G (1986) *Tomate: Variedades, cultivo, pragas e doenças, comercialização*. São Paulo: Nobel.

MATSUMOTO M (2006) Comparison of two fatty acid analysis protocols to characterize and differentiate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Mycoscience** 47: 190–197.

MCCARTNEY HA; FOSTER SJ; FRAAIJE BA; WARD E (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science** 59: 129–142.

MES JJ; WESTSTEIJN EA; HERLAAR F; LAMBALK JJM; HARING MA; CORNELISSEN BJC (1999) Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* divides race 1 into separate virulence groups. **Phytopathology** 89: 156–160.

MICHELSE CB; REP M (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology** 10: 311–324.

MUELLER MRL; TANKSLEY SD; GIOVANNONI JJ; VAN ECK J; STACK S; CHOI D et al. (2005) The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). **Comparative and Functional Genomics** 6: 153–158. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). [DOI: 10.1002/cfg.468]

PANTHEE DR; FOOLAD MR (2012) A reexamination of molecular markers for use in marker-assisted breeding in tomato. **Euphytica** 184: 165–179.

PERALTA IE; MENDONZA L; KNAPP S; SPOONER DM (2006) Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **TGC Report** 56: 6–12.

REIS A; COSTA H; BOITEUX LS; LOPES CA (2005) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 30: 426–428.

REIS A; LOPES CA (2012) Doenças causadas por fungos e distúrbios fisiológicos. p: 179–202. In: CLEMENTE, FMVT; BOITEUX, LS (Orgs). *Produção de tomate para processamento industrial*. Brasília: Embrapa.

REP M; VAN DER DOES C; MEIJER M; VAN WIJK R; HOUTERMAN PM; DEKKER HL; KOSTER CG; CORNELISSEN BJC (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. **Molecular Microbiology** 53: 1373–1383.

REP M; MEIJER M; HOURTERMAN PM; VAN DER DOES HC; CORNELISSEN BJC (2005) *Fusarium*

oxysporum evades *I-3*-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 18: 15–23.

REP M; KISTLER HC (2010) The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. **Current Opinion in Plant Biology** 13: 420–426.

ROWE RC (1980) Comparative pathogenicity and host range of *Fusarium oxysporum* isolates causing crown and root rot of greenhouse and field-grown tomatoes in North America and Japan. **Phytopathology** 70: 1143–1148.

SIMONS G; GROENENDIJK J; WIJBRANDI J; REIJANS M; GROENEN J; DIERGAARDE P; VAN DER LEE T; BLEEKER M; ONSTENK J; DE BOTH M; HARING M; MÊS J; CORNELISSEN B; ZABEAU M; VOS P (1998) Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and once active gene copy. **The Plant Cell** 10: 1055–1068.

SNYDER WC; HANSEN HN (1953) Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopathology** 44:338–342.

SZCZECHURA W; STANIASZEK M; HABDAS H (2013) *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* – The cause of Fusarium crown and root rot in tomato cultivation. **Journal of Plant Protection Research** 53: 172–176.

TAKKEN F; REP M (2010) The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology** 11: 309–314.

THATCHER LF; GARDINER DM; KAZAN K; MANNERS JM (2012) A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 25: 180–190.

VAN DER DOES HC; LIEVENS B; CLAES L; HOUTERMAN PM; CORNELISSEN BJC; REP M (2008a) The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. **Environmental Microbiology** 10: 1475–1485.

VAN DER DOES HC; DUYVESTEIJNA RGE; GOLTSTEINB PM; van SCHIEA CCN; MANDERS EMM; CORBELISSEN BJC; REP M (2008b) Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. **Fungal Genetics and Biology** 45: 1257–1264

VIEIRA EA; NODARI RO; CARVALHO FIF; FIALHO JF (2006) Mapeamento Genético de Caracteres Quantitativos e sua Interação com o ambiente. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. Documentos, nº170. 28pp.

VILELA NJ; MELO PCT; BOITEUX LS; CLEMENTE FMVT (2012). Perfil socioeconômico da cadeia agroindustrial no Brasil. p: 17–27. In: CLEMENTE, FMVT; BOITEUX, LS (Orgs). Produção de tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa.

ZURIAGA E; BLANCA JM; CORDERO L; SIFRES A; BLAS-CERDÁN WG; MORALES R; NUEZ F (2009) Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. **Genetic Resources and Crop Evolution** 56: 39–51.

ZURIAGA E; BLANCA J; NUEZ F (2009) Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences. **Genetic Resources and Crop Evolution** 56: 663–678.

WIT PJGM; MEHRABI R; VAN DEN BURG H; STERGIOPOULOS I (2009) Fungal effector proteins: Past, present and future. **Molecular Plant Pathology** 10: 735–747.

WHITE TJ; ARNHEIM N; ERLICH HA (1989) The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics** 5: 185–189.

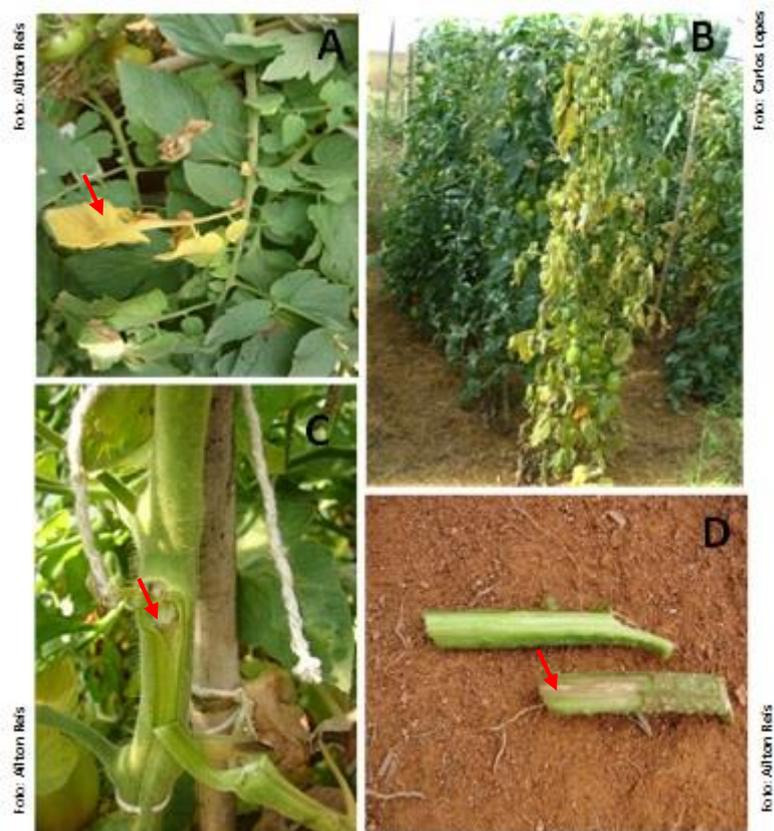


Figura 1 – Sintomas de murcha de fusário em tomateiro. **A** – amarelecimento e morte de folíolos; **B** – amarelecimento e murcha da planta; **C e D** – escurecimento vascular.

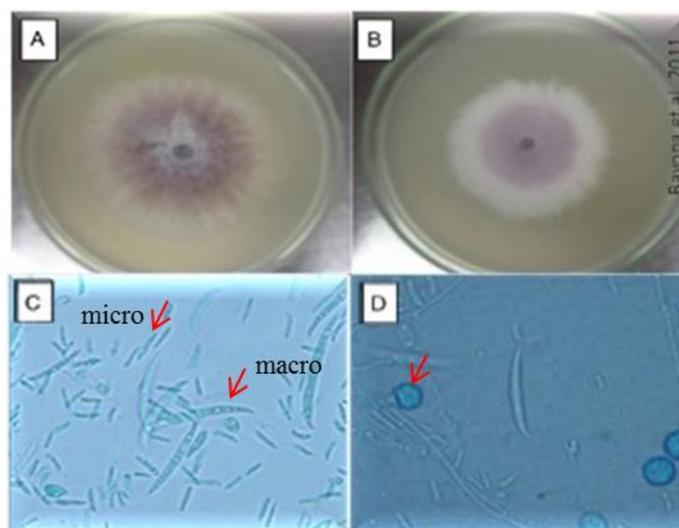


Figura 2 – Aspectos morfológicos de *Fusarium oxysporum*. **A e B**: colônias apresentando coloração pigmentada; **C** – macro e microconídios; **D** – clamidósporos.

CAPÍTULO 2

**Diversidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
associados com o cultivo do tomateiro no Brasil**

Diversidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associados com o cultivo do tomateiro no Brasil

RESUMO - Espécies de *Fusarium* estão entre os fitopatógenos mais cosmopolitas, formando um dos grupos mais diversos em termos genéticos além de apresentarem um amplo perfil de virulência e patogenicidade. A murcha de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen (Fol), é uma das principais doenças que afetam o cultivo do tomateiro em todo o mundo. As raças 1 e 2 do patógeno são as mais comuns e estão distribuídas mundialmente, enquanto a raça 3 ainda apresenta uma distribuição geográfica limitada. O presente trabalho representa a mais extensiva análise da variabilidade de isolados de Fol associados com a murcha de fusário do tomateiro no Brasil. Uma coleção brasileira representativa (contendo 118 isolados) foi caracterizada por meio da reação em acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*) diferenciadores para raças fisiológicas e também utilizando diferentes sistemas de marcadores moleculares desenvolvidos para identificação de raças de Fol. Os ensaios de inoculação permitiram catalogar a presença na coleção de dez isolados da raça 1; 27 isolados da raça 2 e 77 isolados da raça 3. Este levantamento indicou que a raça 3 está presente nos Estados do ES, RJ, BA e confirmou a presença desta raça no Estado de Minas Gerais, expandindo a abrangência geográfica conhecida dessa variante patogênica. A análise da coleção de isolados de Fol indicou que o conjunto de *primers* específicos Uni, Sp13, Sp23 e Spr1 não se mostraram eficientes em diferenciar as raças brasileiras 1 e 2. O padrão molecular específico de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) foi observado em quatro isolados da coleção. A comprovação do primeiro relato desse patógeno no Brasil está dependente apenas dos testes de patogenicidade. O conjunto de *primers* derivado da série gênica *SIX* (*secreted in xylem*) também foi empregado para caracterização dos isolados. No entanto, os padrões genéticos para os *primers* correspondentes aos genes *SIX1* até *SIX7* não foram eficientes em discriminar as raças de Fol. A análise conduzida com 520 *primers* RAPD revelou um baixo nível de

polimorfismo entre os isolados brasileiros das raças 1 e 2, reforçando a noção de que estas duas variantes do patógeno possuem uma estreita proximidade genética. Novos marcadores do tipo raça-específicos foram identificados usando o sistema de marcadores RAPD. Estes novos marcadores podem auxiliar em sistema de caracterização, especialmente de isolados brasileiros das raças 1 e 2 de Fol. Um dos marcadores RAPD polimórficos (OPZ-4) foi clonado e convertido para um marcador do tipo SCAR (*Sequence characterized amplified region*). Esse marcador mostrou elevada especificidade para isolados brasileiros de Fol raça 2, permitindo, na maioria das amostras, discriminar esses isolados daqueles classificados dentro das raças 1 e 3 e também dos isolados disponíveis de Forl. O resultado do alinhamento de sequência da região amplificada pelo SCAR OP-Z4 apresentou elevados níveis de identidade com uma região contendo a família gênica MFS (= “Major Facilitator Superfamily”), que codifica proteínas que facilitam o transporte de múltiplos compostos entre membranas. A caracterização dessa coleção de isolados demonstra a variabilidade de Fol e fornece indicações de que diferentes processos/mecanismos de evolução estão atuando no sentido de selecionar novas raças e variantes genéticas deste patógeno nos diferentes agroecossistemas de cultivo do tomateiro a nível local e global.

Palavras-chave: Murcha de fusário, marcadores moleculares, tomate, discriminação específica de raças, raças brasileiras.

Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates associated with tomato crop in Brazil

ABSTRACT – *Fusarium* species are among the most cosmopolitan pathogens as well as one of the most genetically diverse groups, displaying a wide virulence and pathogenicity profiles. The fusarium wilt [caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen (Fol)] is one of the major diseases that affect tomato crop worldwide. Races 1 and 2 of the pathogen are the most common and are distributed worldwide, while race 3 presents a limited geographical distribution. The present study represents the most extensive variability analysis of *Fol* isolates associated with fusarium wilt disease of tomatoes in Brazil. A representative Brazilian collection (with 118 isolates) was characterized by the reaction of physiological races differential accessions of *Solanum* (sect. *Lycopersicon*) and also using distinct molecular marker systems developed for the specific identification of *Fol* races. Inoculation assays allowed identifying ten race 1 isolates, 27 race 2 isolates, and 77 race 3 isolates in Brazilian collection. This survey indicated that *Fol* race 3 is present in the States of Espírito Santo, Rio de Janeiro and Bahia, and confirmed the new report of this race in the State of Minas Gerais, expanding the geographic distribution of this pathogen variant. Analysis of the collection of *Fol* isolates using the set specific primers Uni, Sp13, Sp23, and Spr1, indicated that this system is not efficient to discriminate isolates of the Brazilian races 1 and 2. However, the specific molecular pattern associated with *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) was observed in four isolates of the Brazilian collection. The final confirmation of this first report of this pathogen in Brazil is dependent upon the pathogenicity tests. The set of primers derived from the gene *SIX* (= *secreted in xylem*) series was also used for characterization of the isolates. However, the amplification patterns for primers corresponding to *SIX1* to *SIX7* genes were not efficient in discriminating Brazilian *Fol* races, being useful only to discriminate Forl and *Fol* isolates. The analysis conducted with 520 RAPD primers revealed a low level of polymorphism among Brazilian isolates of the races 1 and 2, reinforcing the notion that these two pathogenic

variants have close genetic relationship. New race-specific markers were identified using the system of molecular markers. These new markers can help in the race characterization system, especially for Brazilian isolates of Fol races 1 and 2. One of the polymorphic molecular markers (OPZ-4) was cloned and converted into a SCAR marker. This marker showed high specificity for Brazilian Fol race 2, allowing, in most samples, to discriminate these isolates from those classified as races 1 and 3 and also from the available isolates of Forl. The result of the sequence alignment of the genomic region amplified by the SCAR OP-Z4 showed high levels of identity to a region containing the gene family (MFS= "Major Facilitator Superfamily"), which encodes proteins that facilitates the transport of compounds across multiple membranes. In conclusion, the characterization of this collection of isolates demonstrates the overall Fol variability and provides indications that different evolution mechanisms are acting to select new races of the pathogen and genetic variants in different tomato agroecosystems both locally and globally.

Keywords: Fusarium wilt, molecular markers, tomato, race-specific discrimination, Brazilian races.

INTRODUÇÃO

Espécies de *Fusarium* estão entre os fitopatógenos mais cosmopolitas, formando um dos grupos mais diversos em termos genéticos além de apresentarem um amplo perfil de virulência e patogenicidade. Estes fungos possuem uma enorme relevância econômica em um vasto número de plantas hospedeiras, estando envolvidos como agentes causais de várias doenças tais como podridão de raízes, podridões de órgãos aéreos e murchas vasculares (Agrios, 2005; Ma *et al.*, 2010). No cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), a murcha de fusário [causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen (Fol)] é uma das principais doenças que afetam essa hortaliça a nível global.

Três fatores de resistência dominantes e do tipo raça-específicos (*I*, *I-2* e *I-3*) foram geneticamente caracterizados em espécies de *Solanum* (sect. *Lycopersicon*) e introgrididos em variedades comerciais (Huang & Lindhout 1997; Hemming *et al.*, 2004). Até o presente momento, três raças de Fol foram descritas, sendo definidas de acordo com a habilidade de infecção em diferentes acessos das espécies *S. lycopersicum* e de *S. pennellii* que contém esses três genes/fatores de resistência raça-específicos (Alexander & Tucker, 1945; Cirulli & Alexander, 1966; Grattidge & O'Brien, 1982). As raças 1 e 2 de **Fol** estão distribuídas na maioria das áreas produtoras em todos os continentes (Tokeshi & Galli, 1966; Stravato *et al.*, 1999). A raça 3 ainda apresenta uma distribuição geográfica limitada, sendo encontrada em países como Austrália (Grattidge & O'Brien, 1982); Estados Unidos (Volin & Jones, 1982; Davis *et al.*, 1988; Cai *et al.*, 2003), Nova Zelândia, Reino Unido, Venezuela, México (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996) e Brasil (Reis *et al.*, 2005; Reis & Boiteux, 2007). Registros mais recentes apontam a presença de Fol raça 3 também na Coreia, África do Sul e Chile (Choi *et al.*, 2013; Jacobs *et al.*, 2013; Sepúlveda-Chavera *et al.*, 2014).

Análises filogenéticas têm revelado que os fatores de patogenicidade do complexo *F. oxysporum* apresentam distintas origens evolutivas (Suga & Hyakumachi, 2004). Assim, a discriminação de isolados de *F. oxysporum* é seriamente complicada pela essa natureza

polifilética, uma vez que isolados de distintas *formae speciales* podem ser mais relacionados entre si do que aqueles pertencentes a uma mesma *forma specialis*. Outro fator complicador na diagnose do gênero *Fusarium* é a deficiência de ferramentas morfológicas, bioquímicas ou moleculares que propiciem uma diferenciação confiável, dentro de uma mesma espécie, de isolados patogênicos daqueles não patogênicos (Lievens *et al.*, 2008). A detecção e determinação de isolados patogênicos em campo, sementes e mudas é um dos passos mais importantes no manejo das doenças causadas por este fungo (Inami *et al.*, 2010).

Atualmente vários sistemas de marcadores moleculares estão sendo desenvolvidos com o objetivo de diferenciar *formae speciales* e raças de *F. oxysporum*. O enfoque mais importante sido a utilização de marcadores moleculares identificados por genotipagem (Lievens *et al.*, 2008). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* não apresenta um único ancestral comum dentro do complexo *F. oxysporum*. No entanto, Fol contém uma região genômica peculiar e exclusiva que se encontra ausente nas outras *formae speciales* bem como em isolados não patogênicos que pode ser explorada no desenvolvimento de marcadores ligados à patogenicidade (Lievens *et al.*, 2008). Essa região do genoma de Fol engloba o pequeno (ca. 2.0 Mb) e recentemente caracterizado cromossomo 14. Esse cromossomo é a sede de diferentes conjuntos de genes efetores, tais como *SIX1*, *SIX3* e *SIX4*, bem como outros genes presumivelmente relacionados com a patogenicidade. Isolados de Fol pertencentes à clados filogeneticamente distintos compartilham esses grupos de genes sugerindo uma potencial origem polifilética desse patógeno (Inami *et al.*, 2014).

Estudos sistemáticos permitiram a identificação de uma série de genes de avirulência em Fol. Os genes da série SIX (= ‘*secreted in xylem*’) codificam um conjunto relativamente heterogêneo de pequenas proteínas, que receberam essa denominação devido ao fato de elas serem seletivamente secretadas pelo fungo nos vasos do xilema do tomateiro durante o processo de colonização. Como mencionado, algumas dessas proteínas SIX são codificadas por genes

localizados no cromossomo 14 do fungo (Ma *et al.*, 2010) e foram identificadas como necessárias para o reconhecimento do patógeno pela planta (Rep *et al.*, 2004). Um ponto de interesse para caracterização da diversidade de isolados de Fol tem sido o emprego dos genes de série *SIX* em sistemas mais refinados de detecção e identificação de isolados de Fol (Van der Does *et al.*, 2008).

No Brasil, os trabalhos disponíveis de caracterização de isolados de Fol se limitam apenas a inoculação no conjunto de linhagens e acessos diferenciadores de raças (Reis *et al.*, 2005; Reis & Boiteux, 2007). Não foram conduzidos, até o presente momento, trabalhos envolvendo uma caracterização molecular mais refinada e informativa destes isolados. Dentro deste cenário, o objetivo do presente trabalho foi ampliar a análise de diversidade de uma coleção brasileira de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por meio de novos sistemas de marcadores moleculares e conectar essa informação com os dados obtidos em ensaios de patogenicidade e virulência no conjunto de linhagens/acessos diferenciadores de raças fisiológicas desse importante patógeno do tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – Os isolados utilizados no presente estudo (**Tabela 1**) fazem parte da coleção de culturas de fungos fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Esses 118 isolados (obtidos de três regiões do Brasil) foram obtidos de plantas de tomateiro exibindo sintomas similares aos induzidos por Fol (**Tabela 1**). Fazem parte dessa coleção alguns isolados de referência (de distintas raças) obtidos nos Estados Unidos, Reino Unido, Tanzânia, Austrália e Nova Zelândia (**Tabela 1**). Isolados de outras *formae speciales* (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; *F. oxysporum* f. sp. *cepae* e *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*) também foram

incluídos, mas somente nos ensaios moleculares (ver descrição abaixo). Os fungos foram conservados pelo método Castellani (1963) a 10°C. Para recuperação dos isolados os blocos de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) + Tetraciclina (50 µg/mL) e incubados por sete dias em condições controladas de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Para confirmação da espécie, a identificação dos isolados foi feita observando-se as características morfológicas e culturais do fungo e comparando com descrições da literatura (Nelson *et al.*, 1983; Leslie & Summerell, 2006). Além dos isolados de Fol disponíveis na coleção (Reis *et al.*, 2006), durante o desenvolvimento do presente trabalho foram recebidas novas amostras de plantas de tomate sintomáticas (coletadas entre 2012 e 2014), apresentando murcha, amarelecimento e escurecimento vascular. Isolamentos foram feitos de todas essas novas amostras, visando o diagnóstico do agente causal. Estes isolados, também foram caracterizados no presente trabalho.

Reação de cultivares e acessos diferenciadores a isolados de Fol – Para confirmar a patogenicidade e identidade de raça fisiológica dos isolados, foram feitas inoculações em cultivares e acessos diferenciadores para raças de Fol (**Tabela 2**). Os acessos de tomateiro empregados nesses estudos foram ‘Ponderosa’ (suscetível às três raças), ‘Viradoro’ (resistente à raça 1 / locus *I*), ‘Floradade’ (resistente às raças 1 e 2 / loci *I* + *I-2*) e ‘BHRS-2,3’ (resistente às três raças devido à presença do locus *I-7*). Parte dessa coleção de 118 isolados também foi caracterizada para identidade de raça empregando com diferencial o acesso *S. pennelli* ‘LA 716’ que é resistente a isolados da raça 3 devido à presença do locus *I-3*. Para produção de esporos (usados como inóculo), blocos de BDA contendo micélio fúngico foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer com o meio líquido batata dextrose (BD) e mantidos sob agitação constante a 12 horas de luz e temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) por sete dias. Após este período, a suspensão foi filtrada em gaze dupla e a concentração inicial foi estimada, com o auxílio de um hemacitômetro, e em seguida ajustada para 1×10^6 conídios $\times \text{mL}^{-1}$.

Para a semeadura das linhagens diferenciadoras de raças de Fol foram utilizadas bandejas de 128 células contendo substrato esterilizado (Plantmax[®]) e mantidas em condições de casa de vegetação em condições ambiente e com duas irrigações diárias (uma pela manhã e outra pela tarde). Após 21 dias do plantio (DAP) as mudas foram removidas da bandeja e as raízes lavadas para retirar o substrato aderido às mesmas. A porção apical das raízes foi cortada (aproximadamente 2 cm) e mergulhadas em suspensão de esporos por 3 minutos. Em seguida, as plantas inoculadas e plantas controles foram transplantadas para vasos de 1,5 L contendo uma mistura de argila, esterco bovino, areia e palha de arroz carbonizada esterilizada, após a irrigação. Após o transplante, foram adicionados 5 mL da suspensão de conídios no colo de cada plântula. A avaliação foi feita 21 dias após a inoculação usando uma escala de notas variando de 1 a 5, adaptada de Santos (1999), sendo o **1** = plantas sem sintomas; **2** = plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; **3** = plantas com escurecimento vascular intenso e com início de murcha ou amarelecimento foliar; **4** = plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; **5** = plantas mortas. Os isolados foram classificados como patogênicos somente quando sintomas característicos da doença foram observados. A classificação das raças foi feita de acordo com a resposta observada em cada diferenciadora. Ao final da avaliação o fungo foi reisolado das plantas sintomáticas e foi realizado PCR dos reisolamentos para confirmar a identificação.

Caracterização molecular das raças de Fol e de *forma specialis* dos isolados via PCR com sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006) – Foi realizada a extração de DNA genômico de todos os isolados por meio do método CTAB + solventes orgânicos com modificações (Boiteux *et al.*, 1999). A identificação e caracterização molecular foram realizadas por meio de PCR, utilizando um conjunto de *primers* específicos (**Tabela 3**) para identificação e diferenciação de raças de Fol e também de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

(Forl) (Hirano & Arie, 2006; van der Does *et al.*, 2008; Lievens *et al.*, 2009). As reações de PCR foram compostas de 5 µL de DNA genômico (20 ng/ µL), 1,25 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ l), 1 µL de cada primer, 5,95 µL de H₂O Milli-Q com volume total de 15,5 µL. Para os conjuntos de *primers* Uni, Sp13, Sp23 e Sp1 (Hirano & Arie, 2006), o programa utilizado para amplificação dos fragmentos consistiu de um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto, seguido de: 50 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 62°C por 1 minuto para anelamento, e 72°C por 2 minutos para elongação, e ciclo final a 68° por 7 minutos.

Caracterização molecular das raças de Fol e de *forma specialis* dos isolados via PCR com o sistema de marcadores para os genes da série SIX – Para os *primers* SIX1, SIX2 e SIX3 apenas a quantidade de DNA foi modificada (2 µL) e o programa utilizado para amplificação dos fragmentos consistiu de um ciclo inicial de 94°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 64°C (para SIX1), 60°C (para SIX2) e 59°C (para SIX3) por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e ciclo final a 72°C por 10 minutos. Para os *primers* SIX4, SIX5, SIX6 e SIX7 o programa utilizado para amplificação dos fragmentos consistiu de um ciclo inicial de 94°C por 2 minutos seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, 60°C por 45 segundos para anelamento, 72°C por 45 segundos para elongação, e ciclo final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Avaliações de isolados com uma coleção de *primers* RAPD e busca por marcadores associados com as raças brasileiras de Fol – Foi realizada uma busca de marcadores moleculares raça-específicos via a estratégia de RAPD. Para tal, foram formadas três distintas

combinações equimolares de DNA genômico extraído de cinco das diferentes raças (= *bulks* de raças) de Fol disponíveis na coleção de isolados. A busca por polimorfismos entre esses *bulks* contrastantes para as três raças de Fol foram conduzidas empregando uma coleção de 520 *primers* RAPD (Operon, California, EUA). A reação foi composta de 2 µL de DNA genômico (20 ng/ µL), 1,25 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ l), 2 µL de *primer*, 5,95 µL de H₂O Milli-Q com volume total de 12,5 µL. O programa utilizado para amplificação dos fragmentos consistiu de um ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de: 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 36°C por 1 min, e 72°C por 1,5 min, e ciclo final a 68° por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Validação e clonagem dos amplicons RAPD polimórficos entre os *bulks* de raças de Fol –

Os amplicons polimórficos entre as raças do Fol foram validados com uma amostra mais ampla com todos os isolados disponíveis para o presente trabalho (**Tabela 1**). Amplicons estáveis foram removidos do gel de agarose sob luz ultravioleta e purificados utilizando o Kit Invitex Life Technologies® e clonados utilizando o kit pGEM®-T (Promega), seguindo as condições recomendadas pelo fabricante.

Purificação e clonagem de amplicons RAPD polimórficos –

Os marcadores RAPD mais estáveis em discriminar os distintos bulks das raças, tiveram seus amplicons polimórficos extraídos do gel de agarose e purificados. Para a purificação das bandas foi utilizado o *Kit Invitrogen PureLink® (Quick Gel Extraction Kit)*, seguindo as recomendações do fabricante. Para a clonagem de amplicons polimórficos utilizou-se o protocolo *pGEM®-T Easy Vector Systems*, com algumas modificações. A ligação foi feita adicionando a tubos Eppendorf: 0,5 µL

do vetor pGEM; 5 µL do tampão; 1 µL ligase; 0,5 µL de água Milli-Q e 3 µL do produto de PCR (bandas purificadas), totalizando 10 µL de ligação. As reações foram incubadas a 4°C overnight. Após esse período foram adicionados 50 µL de células competentes (JM 109 *High Efficiency Competent Cells*) a 2 µL da reação de ligação, incubando-os em gelo por 20 minutos. O choque térmico foi dado retirando os tubos do gelo e colocando em banho-maria a exatamente 42°C por 45 segundos. Imediatamente os tubos foram retirados e acondicionados em gelo por 2 minutos. Adicionou-se 950 µL de meio LB líquido. As transformações foram incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37°C em condições de constante agitação. Plaqueou-se 100 µL de cada transformação em placas de Petri contendo meio LB + ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Fez-se então a reação de PCR de cada colônia para confirmação e seleção das bactérias que haviam sido transformadas. Na próxima etapa foi feito MiniPrep das colônias selecionadas, para então serem sequenciadas.

Sequenciamento e análise das sequências dos amplicons RAPD polimórficos entre bulks das diferentes raças – O sequenciamento dos amplicons foi realizado em um sequenciador ABI PRISM 3100 do Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças (CNPq), utilizando o Kit ABI Prism BigDye[®] version 3.1 (Applied Biosystems do Brasil) e os iniciadores de síntese do vetor M13 (M13 “reverse” e “forward”). Sequências consenso foram obtidas usando o programa SeqMan (DNASTar) e as sequências nucleotídicas foram analisadas usando EditSeq (DNASTar). A qualidade das sequências foi avaliada através do programa *SeqMan* (Lasergene, Madison, WI) e as sequências de baixa qualidade foram removidas (Allex, 1999). As sequências correspondentes aos fragmentos polimórficos foram obtidas a partir do consenso dos fragmentos sequenciados com os iniciadores senso e anti senso utilizando-se o programa *SeqMan* (Lasergene)[®] DNASTar. As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank na página eletrônica do *National Center for*

Biotechnology Information – NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e analisadas para níveis de identidade, usando o algoritmo BLASTn. O alinhamento das sequências foi realizado por meio do *software Megalign* (*Lasergene*, Madison, WI), utilizando-se o método Clustal W com as seguintes condições: *gap penalty* e *gap length penalty* = 10.

Desenhos de *primers* e condições de PCR para a identificação dos potenciais marcadores SCAR raça-específicos derivados de amplicons RAPD polimórficos – Os amplicons clonados foram sequenciados e serviram de base para o desenho de novos *primers* raça-específicos do tipo SCAR (= ‘*Sequence characterized amplified region*’). Esses *primers* foram desenhados com o auxílio do software Geneious® e posteriormente validados usando amostras de DNA genômico de todos os isolados de Fol da coleção de trabalho. DNA de isolados de outras *formae speciales* (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *cepae* e *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*) também foram incluídos nesses ensaios como controle para a especificidade dos *primers*. Também foram avaliadas diferentes condições de PCR tais como: concentração de DNA genômico e diferentes temperaturas de anelamento e quantidade necessária de ciclos para o funcionamento de cada *primer*.

Para este trabalho, um par de *primers* específico para a raça 2 de Fol foi desenhado com base na sequência clonada do fragmento obtido com o *primer* RAPD OP-Z4 (que se mostrou específico para o *bulk* da raça 2 brasileira). Esse marcador foi posteriormente validado usando amostras de toda a coleção de isolados (**Tabela 1**). Esse par de *primers*, SCAR foi denominado R2BR-F (5’ GGT-CCT-TCC-AAT-GCT-ATT-GTT-C 3’) e R2BR-R (5’ TGG-ACG-TGT-CAG-TGG-ATT-CT 3’). A reação foi composta de 2 µL de DNA genômico (50 ng/ µL), 1,25 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ l), 0,5 µL de cada *primer*, 5,95 µL de H₂O Milli-Q com volume total de 11,5 µL. O programa utilizado para amplificação

consistiu de um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido de: 25 ciclos de 94°C por 30 seg para a desnaturação, 55°C por 30 seg para anelamento, e 72°C por 45 seg para alongação, e ciclo final a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram observados utilizando desde 1ng/μL de DNA genômico por reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características culturais e morfológicas dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) – Todos os isolados da coleção foram identificados como *Fusarium oxysporum* de acordo com as características morfológicas e culturais (Nelson *et al.*, 1983; Leslie & Summerell, 2006). Todos os isolados confirmados como *Fusarium oxysporum* foram submetidos a avaliações e ensaios adicionais visando à identificação das raças e a caracterização molecular usando distintos sistemas de marcadores.

Caracterização de raças de Fol na coleção de isolados empregando ensaios de inoculação em acessos diferenciadores de raças fisiológicas – Todos os isolados da coleção coletados até o ano de 2011 já haviam sido previamente caracterizados quanto à raça por meio de inoculação em acessos e cultivares diferenciadoras (Reis *et al.*, 2005; 2006; Reis & Boiteux, 2007; Barboza *et al.*, 2013). Os demais isolados foram caracterizados no presente trabalho. Os isolados coletados até o ano de 2002 foram identificados exclusivamente como pertencentes a raça 1 ou raça 2. Por sua vez, os isolados coletados após esse período foram identificados como sendo exclusivamente pertencentes à raça 3, sendo a maioria proveniente dos Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro (Urban, 1994; Reis *et al.*, 2006). A literatura registra a presença da raça 3 de Fol no Brasil, no Estado de São Paulo, no ano de 1966 (Tokeshi *et al.*, 1966). No entanto, estudos posteriores comprovaram que o mesmo isolado pertencia de fato a raça 2 (Tokeshi & Noguez, 1974). Desta forma, o primeiro registro formal de isolados da raça 3 de Fol no Brasil

foi feito no Estado do Espírito Santo (Reis *et al.*, 2005) e, pouco tempo depois, no Estado do Rio de Janeiro (Reis & Boiteux, 2007). A ocorrência da raça 3 permaneceu, após esses dois registros iniciais, geograficamente restrita a essas duas regiões produtoras.

Todos os isolados de *Fusarium* patogênicos ao tomateiro recebidos durante a realização do presente trabalho (entre 2012 a 2014) foram identificados como pertencentes à Fol raça 3, resultado esperado, já que a maioria das cultivares plantadas apresentam resistências as raças 1 e 2 de Fol. Assim, neste prosseguimento do estudo sobre a distribuição de isolados de Fol no Brasil, foram identificados isolados da raça 3 infectando plantas de tomateiro no Estado da Bahia (Barboza *et al.*, 2013), confirmando a expansão dessa variante do patógeno também para a região Nordeste do Brasil.

Posteriormente, novos isolados (coletados entre 2012 e 2014 na região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais), se mostraram patogênicos a todas as diferenciadoras, com exceção do acesso 'BHRS2-3' (**Figura 1**), demonstrando também pertencerem à raça 3. Esse foi o primeiro registro formal da raça 3 no Estado de Minas Gerais (Gonçalves *et al.*, 2013), evidenciando o rápido avanço desta variante para distintas regiões produtoras de tomate no Brasil (**Figura 2**). Levantamentos mais recentes indicaram que a raça 3 ainda não está presente nas regiões de plantio de tomate indústria localizadas no Planalto Central do Brasil (Reis & Lopes, 2012). Em resumo, os ensaios de inoculação no conjunto de acessos diferenciais permitiram catalogar a presença na coleção de dez isolados da raça 1; 27 isolados da raça 2 e 77 isolados da raça 3, coletados ao longo das últimas três décadas e amostrando algumas das principais regiões produtoras de tomate no país.

Caracterização molecular dos isolados de Fol com o sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006) – Todos os isolados da coleção foram inicialmente caracterizados quanto à raça com marcadores moleculares (obtidos via PCR) utilizando os *primers* raça-específicos

desenvolvidos por Hirano & Arie (2006) (**Tabela 3**). Para os *primers* Uni, Sp13, Sp23 e Spr1 um resultado inesperado foi observado. Todos os isolados brasileiros identificados como raça 1 e 2 por testes de virulência em hospedeiras diferenciais, apresentaram padrões de amplicons idênticos (positivo para Uni e Sp13, e negativo para os demais). Esse padrão de amplicons é relatado na literatura internacional como sendo específicos para isolados de Fol raça 1. Esse resultado indica que os isolados brasileiros da raça 2 possuem um perfil peculiar/único (**Figura 3**), quando comparados com isolados dessa mesma raça analisados em outros países (Hirano & Arie, 2006; Balogun *et al.*, 2008; Baysal *et al.*, 2009). Desta forma, de maneira inesperada, o sistema “universal” proposto para identificação de raças usando o conjunto de *primers* Uni, Sp13, Sp23 e Spr1 não se mostrou útil para discriminar os isolados brasileiros de Fol raça 1 e raça 2.

O surgimento de novas raças se dá em geral pelo uso intensivo de cultivares com resistência às raças já existentes do patógeno, o que pode não ter acontecido com a raça 2 isolada no Brasil. Isolados da raça 2 foram inicialmente descritos em São Paulo em campos de produção onde nunca se fez o plantio de mudas originárias de outras áreas, eliminando a hipótese de introdução de outro local e reforçando a ideia de uma origem endêmica do isolado. Assim, a oportunidade de seleção unilateral para esta raça não ocorreu, já que a variedade cultivada na região era a Santa Cruz (suscetível a todas as raças de Fol). Diante disso, foram propostas por Tokeshi & Galli (1966) duas hipóteses para explicar a ocorrência da raça 2 no Brasil: **(1)** alta frequência de mutação da raça 1 para a raça 2; e **(2)** que essa mutação ocorreu no sentido de ampliar o perfil de virulência e agressividade dos isolados previamente existentes nas regiões produtoras de tomate no Brasil. De fato, isolados de Fol da raça 2 coletados na Espanha em plantas suscetíveis foram mais virulentos que os isolados da raça 1 (Tello & Lacasa, 1988). Da mesma forma, Sibounnavong *et al.* (2012) observaram a variação genética entre isolados de Fol formando grupos de virulência onde os isolados da raça 2 foram classificados como os de mais

alta virulência.

Os dados moleculares gerados aqui evidenciam que as duas hipóteses podem estar corretas. Os isolados disponíveis da raça 2 brasileira podem ser realmente resultantes de uma mutação de isolados originais da raça 1, já que o padrão de amplicons usando o conjunto de *primers* Uni, Sp13, Sp23 e Sprl foi idêntico para todos os isolados analisados das duas raças. E, de maneira similar, essa mutação também ampliou o perfil bem como os níveis de virulência desses isolados como previamente descrito por Tokeshi & Galli (1966).

Em relação à raça 3, todos os isolados dessa variante do patógeno classificados pelos testes de virulência apresentaram padrão de *amplicons* específicos para esta raça (positivo para Uni, Sp13, Sp23 e negativo para Sprl), estando de acordo com o perfil observado com isolados caracterizados em outras regiões do mundo (Hirano & Arie, 2006; Balogun *et al.*, 2008; Baysal *et al.*, 2009). Desta forma, foi observada uma completa correlação entre os testes de virulência e a caracterização molecular para os isolados da raça 3, utilizando o conjunto de *primers* Uni, Sp13, Sp23 e Sprl (**Figura 3**). Esses dados validam estes marcadores como “universais” para as raças 1 e 3 de Fol. Isto confirma a utilidade destes *primers* para uma identificação rápida e precisa de subgrupos de isolados desse patógeno.

Outro resultado inicialmente não esperado foi a obtenção de amplicons de aproximadamente 947 bp para o *primer* Sprl quando empregando DNA genômico de quatro isolados (Fus 22, 189, 190 e 289), indicando um padrão reportado na literatura com sendo específico do patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* – Forl (**Figura 3**). DNA genômico de isolados referência de Forl (denominados como Fus 63k e Fus 66k), disponibilizados pela Embrapa Quarentena Vegetal, foram então utilizados para a validação dos *primers* e confirmar a identidade de Fus 22, Fus 189, Fus 190 e Fus 289 (**Figura 4A**) como sendo isolados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Os padrões dos amplicons observados para estes isolados confirmaram a estabilidade na identificação molecular dessa *forma*

specialis. No entanto, não foi possível ainda confirmar a patogenicidade dos isolados Fus 22, Fus 189, Fus 190 e Fus 289, o que não nos permite afirmar, com certeza, que os mesmos sejam *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

Não há dúvida que esses isolados supostamente classificados como *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* correspondem morfológicamente ao complexo grupo de *F. oxysporum* Schelecht. No entanto, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* não é um patógeno indutor de murcha vascular como Fol (Jarvis *et al.*, 1975; Jarvis & Shoemaker, 1978; Çolak & Biçici, 2013). Curiosamente, os isolados Fus 22, Fus 189, Fus 190 e Fus 289 apresentaram essa mesma característica, pois eles foram isolados de plantas sem sintomas típicos para murcha de fusário. Isolados de Forl, diferentemente do comportamento observado para isolados de Fol, causam podridão de colo e escurecimento radicular (**Figura 4B**) e necessitam de temperatura amena para infectar e induzir sintomas (Jarvis & Thorpe, 1976; Kim *et al.*, 2001). O desenvolvimento ótimo deste patógeno situa-se entre 18° e 20°C. Em substratos com temperaturas mais elevadas, a infecção pode eventualmente ocorrer, mas permanece assintomática ou causa leve escurecimento dos tecidos da raiz (Szczuchura *et al.*, 2013). Forl não é específico do tomateiro e pode infectar também espécies de *Capsicum*, berinjela, beterraba, espinafre, soja, vagem e pepino, apresentando assim uma gama mais ampla de plantas hospedeiras (Menzies *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2001). O patógeno Forl é considerado uma praga quarentenária A1 (ausente) para o Brasil (MAPA, 2015). Desta forma, ensaios de virulência sob ambiente e condições controladas estão em andamento para a confirmação da presença deste patógeno no País.

Ficou evidente que os *primers* desenhados por Hirano & Arie (2006), utilizando informação genética de isolados japoneses, não foram eficientes em diferenciar isolados brasileiros das raças 1 e 2 de Fol. Discrepâncias também foram encontradas por Çolak & Biçici (2013) em isolados de Fol raça 3 e Forl da Turquia entre os resultados da sintomatologia, morfologia dos isolados e dos resultados obtidos via PCR com o conjunto *primers* desenvolvido

por Hirano & Arie (2006). Além da identificação dos isolados esses marcadores também vêm sendo testados para detecção do patógeno durante o processo de infecção. Balogun *et al.* (2008) conseguiram detectar com eficiência o patógeno em folhas e raízes de plantas inoculadas, incluindo inoculações com uma mistura de raças de Fol. Um problema potencial com essa detecção direta via PCR nos tecidos da planta pode se manifestar durante uma eventual co-infecção pelas raças 1 e 2 do patógeno. A análise conjunta com DNA genômico de isolados dessas duas raças pode levar a uma interpretação errônea, já que a amplificação positiva para os dois *primers* (Sp13 e Sp23) pode falsamente indicar a presença da raça 3.

Caracterização molecular das raças de Fol e de *forma specialis* dos isolados via PCR com o sistema de marcadores para os genes da série SIX – Diante dos resultados obtidos com o sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006), uma caracterização adicional dos isolados foi conduzida utilizando o conjunto de *primers* específicos para os genes da série SIX (Rep *et al.*, 2004, Houterman *et al.*, 2007; 2008; 2009). O emprego desses genes tem se mostrado uma técnica bastante robusta para discriminar tanto *forma specialis* quanto as distintas raças de Fol. A estreita conexão entre esse grupo de genes e a patogenicidade fazem deles potenciais marcadores do tipo hospedeiro-específico (Lievens *et al.*, 2009). Segundo van der Does *et al.* (2008), existe uma correlação de 100% entre a habilidade de causar murcha de fusário e a presença dos genes *SIX1* e *SIX2*. Desta forma, os genes *SIX1*, *SIX2*, *SIX3*, *SIX5* podem, em combinação, serem utilizados para uma identificação inequívoca ao nível da *forma specialis lycopersici*. O gene *SIX4* tem sido empregado para identificação de isolados da raça 1, enquanto o polimorfismo no *SIX3* pode ser explorado para diferenciar isolados da raça 2 e 3 (Lievens *et al.*, 2009).

Os dados de caracterização dos isolados para os genes da série *SIX* estão apresentados na **Tabela 1**. Esses ensaios revelaram alguns resultados inesperados ainda não reportados na

literatura. Foram, observadas algumas ampliações para o marcador *SIX4* (relatado como específico para isolados da raça 1) em isolados brasileiros caracterizados por testes de virulência como pertencentes às raças 2 e 3. Da mesma forma, não foram observadas ampliações para alguns *primers SIX* em vários isolados da coleção brasileira de isolados. No entanto, para os quatro isolados tentativamente caracterizados como Forl, foram observadas ampliações diversas para os diferentes *primers SIX*. Amplificação positiva para *SIX1* e *SIX2* com o DNA genômico de Fus 189 e Fus 190 e positiva para *SIX1*, *SIX2*, *SIX5* e *SIX6* para o isolado Fus 289. Apenas o perfil de amplicons do isolado Fus 22 se mostrou de acordo com as descrições da literatura, isto é, ampliações negativas para todos os marcadores *SIX*. Todas as reações foram repetidas no mínimo duas vezes.

Novas culturas monospóricas, assim como todas as outras avaliações, serão realizadas com os isolados que demonstraram resultados discrepantes com os relatados na literatura. Assim, é possível definir se houve isolamento simultâneo de duas raças, ou mistura de isolados em algumas das etapas do presente estudo. Outra hipótese é que a composição genética dos isolados brasileiros é distinta dos isolados para os quais esse conjunto de *primers* foi desenvolvido e validado. E até mesmo, se os isolados classificados como Forl não representem outra *forma specialis* ainda não definida e/ou caracterizada.

Os genes da série *SIX* foram inicialmente descritos como exclusivos de isolados de Fol. No entanto, em trabalhos recentes genes análogos aos da série *SIX* têm sido também detectados em outras *formae speciales* (Fraser-Smith *et al.*, 2014). Mais recentemente, novas proteínas foram descobertas no xilema de plantas de tomateiro infectadas que ainda não haviam sido identificadas e foram denominadas de *SIX8* até *SIX14* (Meldrum *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2013). Por exemplo, o gene *SIX1* foi detectado nas *formae speciales conglutinans*, *cubense*, *fragariae*, *medicaginis*, *melonis*, *pisi* e *vasinfectum*; *SIX2* em *cubense*; *SIX4* em *conglutinans*, *cubense*, *niveum* e *vasinfectum*; *SIX6* em *cubense*, *melonis*, *niveum*, *passiflorae*, *radicis-*

cucumerinum e *vasinfectum*; *SIX7* em *cubense*, *lilii* e *zingiberi*; *SIX8* em *conglutinans*, *cubense*, *medicaginis*, *niveum*, *passiflorae*, *rafhani* e *vasinfectum*; *SIX9* em *conglutinans*, *cubense*, *niveum*, *passiflorae*, *radicis-lycopersici*, *rafhani* e *vasinfectum*; *SIX10* em *zingiberi*; *SIX11* em *melonis*, *niveum* e *passiflorae*; *SIX12* em *zingiberi*; *SIX13* em *cubense*, *fragariae*, *medicaginis*, *melonis*, *niveum*, *pisi*, e *vasinfectum*; e *SIX14* em *pisi* (Thatcher *et al.*, 2012; Meldrum *et al.*, 2012; Kashiwa *et al.*, 2013; Fraser-Smith *et al.*, 2014).

Os genes da série *SIX* podem ter funções diferentes para as diferentes *formae speciales*, no entanto, estão todos relacionados com a patogenicidade. Por exemplo, o gene *SIX1* (que em Fol é hospedeiro-específico) para *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) está envolvido na patogenicidade em geral, enquanto *SIX7* e *SIX8*, estão presentes somente na raça 4 de Foc, desempenhando um papel cultivar-específico (Meldrum *et al.*, 2012).

Embora tenham sido verificadas algumas discrepâncias entre a caracterização conduzida no presente estudo e as descrições da literatura, os padrões genéticos demonstraram uma alta correlação com a identidade do patógeno, em que a discriminação das raças do patógeno e a *formae specialis* foi considerada (Lievens *et al.*, 2009; Baysal *et al.*, 2009). Isto evidencia a utilidade dos *primers* selecionados para a discriminação do patógeno. No entanto, não há, até o presente momento, nenhum estudo molecular de identificação e caracterização que envolva isolados do Brasil, somente isolados da Europa, Ásia e América do Norte e Central. Neste contexto, se faz necessário um estudo mais abrangente que envolva isolados de todas as regiões produtoras do Brasil, inclusive utilizando isolados mais antigos disponíveis em coleções de fungos fitopatogênicos de outras Instituições.

Avaliações de isolados das diferentes raças de Fol com uma coleção de *primers* RAPD e identificação de marcadores RAPD para as diferentes raças de Fol – Dos 520 *primers* utilizados no presente estudo, 60 se mostraram polimórficos entre os *bulks* das três raças de Fol (**Tabela 4; Figura 5**), demonstrando que há uma diversidade relativamente elevada entre as

mesmas. Ao mesmo tempo, ficou ainda mais claro a ligação e/ou origem comum dos isolados brasileiros das raças 1 e 2, já que os polimorfismos encontrados variavam muito mais entre isolados dessas raças e isolados da raça 3 do que entre os isolados das raças 1 e 2 (**Figura 5**). Apenas um *primer* (OPV-20) revelou um polimorfismo específico para a raça 1 e três *primers* (OPM-02, OPX-20 & OPZ-04) revelaram polimorfismos específicos para isolados da raça 2. Análises de diversidade genética entre as raças de Fol, com este sistema de marcadores, demonstraram que a distância genética entre isolados das raças 1 e 2 é de 7%, e que eles formam um agrupamento único (Kuramae & Souza, 2002; Amaral *et al.*, 2013; Albuquerque *et al.*, 2014).

Um dos marcadores RAPD polimórficos (OPZ-4) foi clonado e convertido para um marcador do tipo SCAR (*Sequence characterized amplified region*). Esse marcador (denominado como R2BR) mostrou elevada especificidade para isolados brasileiros de Fol raça 2, permitindo, na maioria das amostras, discriminar esses isolados daqueles classificados dentro das raças 1 e 3 e também dos isolados disponíveis de Forl. O resultado do alinhamento de sequência da região amplificada pelo SCAR OP-Z4 (= R2BR) apresentou elevados níveis de identidade com uma região MFS (= “*Major Facilitator Superfamily*”) do genoma Fol (**Figura 6**). Essa família gênica codifica proteínas que facilitam o transporte de múltiplos compostos entre membranas e pode ser um interessante gene candidato para definição do perfil de virulência e/ou patogenicidade de Fol.

Os isolados Fus 26 e Fus 293, caracterizados como pertencentes à raça 2 por testes de virulência, não apresentaram amplicons para o par de *primers* R2BR. No entanto, estes mesmos isolados apresentaram amplicons para SIX4, que é específico para raça 1 de Fol de acordo com os dados de Houterman *et al.* (2009). Esse resultado demonstra que esses isolados podem realmente pertencer à raça 1 e que, durante os testes de virulência, conseguiram superar ou “quebrar” o fator de resistência codificado pelo gene *I-2* de resistência. Ao mesmo tempo, não

foi observado amplicom para o isolado Fus 28, o único caracterizado como raça 2 que foi coletado no Estado de São Paulo.

A amplificação das bandas também foi observada nos isolados Fus 119, sendo o único isolado da raça 3 que isso ocorreu. O mesmo padrão de amplificação também foi observado nos isolados referência Forl 63k, Forl 66k e nos dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) utilizados. Isso é bastante comum entre isolados de *F. oxysporum*, já que para determinados grupos de genes, os isolados de *formae speciales* diferentes podem ser mais próximos que isolados da mesma *forma specialis*.

Diante disso, pode ter ocorrido então a seleção de uma característica específica desses isolados para essa região geográfica, já que todos os isolados que a apresentaram são procedentes do Estado de Pernambuco. Assim, essa característica pode estar relacionada a alguma adaptação ambiental ou alguma mutação de caráter ainda endêmico. Isolados desta raça, pertencentes a outras regiões geográficas, devem ser incluídos na coleção para que se tenha um melhor entendimento da relação evolutiva entre as raças de Fol isoladas no Brasil.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente trabalho representa a mais extensiva análise da variabilidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associados com a murcha de fusário do tomateiro no Brasil;
- Uma coleção brasileira de 118 isolados de *Fusarium oxysporum* associados com o tomateiro foi caracterizada por meio da reação em acessos de *Solanum* (sect.

Lycopersicon) diferenciadores para raças fisiológicas do fungo e também utilizando sistemas de marcadores moleculares desenvolvidos para identificação de raças de Fol;

- Os ensaios de inoculação permitiram catalogar a presença na coleção de dez isolados da raça 1; 27 isolados da raça 2 e 77 isolados da raça 3, de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* coletados ao longo das últimas três décadas e amostrando algumas das principais regiões produtoras de tomate no país;
- É interessante relatar que todos os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* coletados a partir do ano de 2003 foram identificados como raça 3 por testes de virulência. O presente levantamento indicou que a raça 3 está presente no ES, RJ, BA e confirmou a presença desta raça no Estado de Minas Gerais, expandindo a abrangência geográfica conhecida dessa variante patogênica;
- A análise da coleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* indicou que o conjunto de *primers* específicos Uni, Sp13, Sp23 e Sp14 desenvolvido por Hirano & Arie (2006) não se mostrou eficiente em diferenciar as raças brasileiras 1 e 2, que apresentaram padrão de amplicons idênticos para todos os isolados e correspondentes aos descritos para a raça 1. No entanto, em relação aos isolados brasileiros da raça 3, o sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006) apresentou uma completa correspondência entre os testes de virulência e o padrão molecular;
- Um resultado surpreendente foi a detecção de um padrão molecular específico de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl), em quatro isolados da coleção das regiões de SP, ES e CE, que é um patógeno ainda não descrito no território brasileiro. A comprovação do primeiro relato desse patógeno está dependente apenas dos testes de patogenicidade ora em andamento;
- O conjunto de *primers* derivado da série gênica *SIX* (*secreted in xylem*) também foi empregado para caracterização dos isolados. No entanto, os padrões genéticos para os

primers correspondentes aos genes *SIX1* até *SIX7* não se mostraram eficientes em discriminar as raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*;

- A análise conduzida com 520 *primers* RAPD revelou um baixo nível de polimorfismos (em torno de 7%) entre os isolados brasileiros das raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, reforçando a hipótese de que estas duas variantes do patógeno possuem uma estreita proximidade genética;
- Novos marcadores do tipo raça-específicos foram identificados usando o sistema de marcadores RAPD. Estes novos marcadores podem auxiliar em sistema de caracterização, especialmente de isolados brasileiros das raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*;
- Um dos marcadores RAPD polimórficos (OPZ-4) foi clonado e convertido para um marcador do tipo SCAR (*Sequence characterized amplified region*). Esse marcador mostrou elevada especificidade para isolados brasileiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2, permitindo, na maioria das amostras, discriminar esses isolados daqueles classificados dentro das raças 1 e 3 e também dos isolados disponíveis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*;
- O resultado do alinhamento de sequência da região amplificada pelo SCAR OP-Z4 apresentou elevados níveis de identidade com uma região MFS (= “Major Facilitator Superfamily”) do genoma *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Essa família gênica codifica proteínas que facilitam o transporte de múltiplos compostos entre membranas e pode ser um gene candidato para definição do perfil de virulência e/ou patogenicidade;
- A caracterização dessa coleção de isolados demonstra a variabilidade global desse patógeno e fornece indicações de que diferentes processos/mecanismos de evolução estão atuando no sentido de selecionar novas raças e variantes deste patógeno nos diferentes agroecossistemas de cultivo do tomateiro nas diferentes regiões geográficas;

- Os resultados aqui obtidos também são importantes para os programas de melhoramento, pois demonstram que mesmo com a utilização de cultivares resistentes as raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* continuam ao longo do tempo no ambiente em constante interação com a hospedeira, permitindo que eventos evolucionários continuem ocorrendo com isolados de todas as três raças já descritas;

LITERATURA CITADA

AGRIOS GN (2005) Plant Pathology: Academic Press. 5th.

ALBUQUERQUE LP; SANTANA GMS; NAPOLEÃO TH; COELHO LCBB; SILVA MV; PAIVA PMG (2014) Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 172: 1098–1105.

ALEXANDER LJ, TUCKER CM (1945) Physiologic specialization in the tomato wilt fungus: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Agricultural Research** 70: 303–313.

AMARAL DOJ; ALMEIDA CMA; MALAFAIA CB; SILVA MLRB; CORREIA MTS; LIMA VLM; SILVA MV (2013) Identification of races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by molecular markers. **African Journal of Microbiology Research** 7: 2324–2331.

BALOGUN OS; HIRANO Y; TERAOKA T; ARIE T (2008) PCR-based analysis of disease in tomato singly or mixed inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 1 and 2. **Phytopathologia Mediterranea** 47: 50–60.

BARBOZA EA; CABRAL CS; GONÇALVES AM; REIS A; FONSECA MEN; BOITEUX LS (2013) Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in Northeast Brazil. **Plant Disease** 97: 422.

BAYSAL Ö; SIRAGUSA M; IKTEN H; POLAT I; GÜMRÜKCÜ E; YIGIT F; CARIMI F; TEIXEIRA DA SILVA JA (2009) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and theirs genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 74: 68–75.

BOITEUX LS; FONSECA MEN; SIMON PW (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science** 124:32–38.

CAI G; GALE LR; SCHNEIDER RW; KISTLER HC; DAVIS RM; ELIAS KS; MIYAO EM (2003) Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. **Phytopathology** 93: 1014–1022.

CASTELLANI A (1963) The water cultivation of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 44 (2): 217- 220.

CHOI H-W; HONG SK; LEE YK; SHIM HS (2013) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing fusarium wilt on tomato in Korea. **Plant Disease** 97: 1377.

CIRULLI M; ALEXANDER LJ (1966) A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology** 56: 1301–1304.

ÇOLAK A; BIÇICI M (2013) PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in protected tomato- growing areas of the eastern Mediterranean region of Turkey. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 37: 457–467.

DAVIS RM; KIMBLE KA; FARRAR JJ (1988) A third race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identified in California. **Plant Disease** 72: 453.

FAZIO G; STEVENS MR; SCOTT JW (1999) Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Frl*) in tomato. **Euphytica** 105: 205–210.

GABE HL (1975) Standardization of nomenclature for pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Transactions of the British Mycological Society** 64: 156–159.

GRATTIDGE R; O'BRIEN RG (1982) Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Disease** 66: 165–166.

GONÇALVES ADM; AGUIAR FM; LOPES CA; FONSECA MEN; BOITEUX LS; COSTA H; REIS A (2013) Primeiro registro de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 3 no Estado de Minas Gerais In: 46° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Ouro Preto: UFV, 757-1.

HIRANO Y; ARIE T (2006) PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of General Plant Pathology** 72:273–283.

HEMMING MN; BASUKI S; McGRATH DJ; CARROLL BJ; JONES DA (2004) Fine mapping of the tomato I-3 gene for Fusarium wilt resistance and elimination of co-segregating resistance gene analogue as a candidate for I-3. **Theoretical and Applied Genetics** 109: 409–418.

HOUTERMAN PM; SPEIJER D; DEKKER HL; KOSTER CG; CORNELISSEN BJC; REP M (2007) The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology** 8: 215–221.

HOUTERMAN PM; CORNELISSEN BJC; REP M (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. **PLoS Pathogen** 4(5): 1000061

INAMI K; YOSHIOKA C; HIRANO Y; KAWABE M; TSUSHIMA S; TERAOKA T; ARIE T (2010) Real-time PCR for differential determination of the tomato wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, and its races. **Journal of General Plant Pathology** 76:116–121.

INAMI K; KASHIWA T; KAWABE M; ONOKUBO-OKABE A; ISHIKAWA N; PÉREZ ER; HOZUMI T;

CABALLERO LA; BALDARRAGO FC; ROCO MJ; MADADI KA; PEEVER TL; TERAOKA T; KODAMA M; ARIE T (2014) The tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* shares common ancestor with nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from wild tomato in the Peruvian Andes. **Microbes and Environments** 29 (2): 200–210.

JACOBS A; GOVENDER R; VAN HEERDEN SW (2013) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing tomato wilt in South Africa. **Australasian Plant Disease Notes** 8: 145–147.

JARVIS WR; THORPE HJ; MacNEIL BH (1975) A foot and root disease of tomato caused by *Fusarium oxysporum*. **Canadian Plant Disease Survey** 55: 25–26.

JARVIS WR; THORPE HJ (1976) Susceptibility of *Lycopersicon* species and hybrid to the foot and root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. **Plant Disease Reporter** 60: 1076–1031.

JARVIS WR; SHOEMAKER RA (1978) Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. **Phytopatology** 68: 1679–1680.

KASHIWA T; INAMI K; FUJINAGA M; OGISO H; YOSHIDA T; TERAOKA T; ARIE T (2013) An avirulence gene homologue in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 functions as a virulence gene in the cabbage yellows fungus *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*. **Journal of General Plant Pathology** 79: 412–421.

KIM JT; PARK IH; HAHM YI; YU SH (2001) Crown and root rot of greenhouse tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Korea. **Plant Pathology Journal** 17:290–294.

KURAMAE EE; SOUZA NL (2008) Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum** 24: 1481–1485.

LESLIE JF; SUMMERELL BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. 388p.

LIEVENS B; REP M; THOMMA BPHJ (2008) Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. **Pest Management Science** 64: 781–788.

LIEVENS B; HOURTERMAN PM; REP M (2009) Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. **FEMS Microbiology Letters** 300:201–215.

MA LJ; VAN DER DOES HC; BORKOVICH KA; COLEMAN JJ; DABOUSSI MJ; PIETRO AD; DUFRESNE M; FREITAG M; GRABHERR M; HENRISSAT B; HOUTERMAN PM; KANG S; SHIM WB; WOLOSHUK

C; XIE X; XU JR; ANTONIW J; BAKER SE; BLUHM BH; BREAKSPEAR A; BROWN DW; BUTCHKO RAE; CHAPMAN S; COULSON R; COUTINHO PM; DANCHIN EGJ; DIENER A; GALE LR; GARDINER DM; GOFF S; HAMMOND-KOSACK KE; HILBURN K; HUA-VAN A; JONKERS W; KAZAN K; KODIRA CD; KOEHRSEN M; KUMAR L; LEE YH; LI L; MANNER JM; MIRANDA-SAAVEDRA D; MUKHERJEE M; PARK G; PARK J; PAR SY; PROCTOR RH; REGEV A; RUIZ-ROLDAN MC; SAIN D; SAKTHIKUMAR S; SYKES S; SCHWARTZ DC; TURGEON BG; WAPINSKI I; YODER O; YOUNG S; ZENG Q; ZHOU S; GALAGAN J; CUOMO CA; KISTLER HC; REP M (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature** 464: 367–373.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2015) Lista de pragas Quarentenárias Ausentes (A1). Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/sanidade-vegetal/quarentena>

MELDRUM RA; FRASER-SMITH S; TRAN-NGUYEN LTT; DALY AM; AITKEN EAB (2012) Presence of putative pathogenicity genes in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Australia. **Australasian Plant Pathol.** 41: 551–557.

MENZIES JG; KOCH C; SEYWERD F (1990) Additions to the host range of *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Plant Disease** 74: 569–572.

NELSON; TOUSSOUN; MARASAS (1983) *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. 193pp.

REIS A; COSTA H; BOITEUX LS; LOPES CA (2005) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 30: 426–428.

REIS A; BOITEUX LS; URBEN AF; COSTA H (2006) Estabelecimento e caracterização a nível de raça de uma coleção de isolados *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Nº19. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. 8pp.

REIS A; BOITEUX LS (2007) Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Horticultura Brasileira** 25: 451–454.

REP M; VAN DER DOES C; MEIJER M; VAN WIJK R; HOUTERMAN PM; DEKKER HL; KOSTER CG; CORNELISSEN BJC (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. **Molecular Microbiology** 53: 1373–1383.

SANTOS JRM (1999) Protocolo de Tecnologia: Tomateiro/ Murcha de fusário (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). **Comunicado Técnico**, Nº11. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças 4pp.

SCHMIDT SM; HOUTERMAN PM; SCHREIVER I; MA L; AMYOTTE S; CHELLAPPAN B; BOEREN S; TAKKEN FL; REP M (2013) MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. **BMC Genomics** 14: 119

SEPÚLVEDA-CHAVERA G; HUANCA W; SALVATIERRA RE; LATORRE BA (2014) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes in the Azapa Valley of Chile. **Plant Disease** 98: 1432

SIBOUNNAVONG P; UNARTNGAM J; SOYTONG K (2012) Genetic variation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from tomatoes in Thailand using pathogenicity and AFLP markers. **African Journal of Microbiology Research** 6: 5636–5644.

STRAVATO VM; BUONAURIO R; CAPPELLI C (1999) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 on tomato in Italy. **Plant Disease** 83: 967.

SUGA H; HYAKUMACHI M (2004) Genomics of phytopathogenic *Fusarium*. **Applied Mycology and Biotechnology**: 161–189.

SZCZECURA W; STANIASZEK M; HABDAS H (2013) *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* – The cause of Fusarium crown and root rot in tomato cultivation. **Journal of Plant Protection Research** 53: 172–176.

THATCHER LF; GARDINER DM; KAZAN K; MANNERS JM (2012) A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 25: 180–190

TELLO JC; LACASA A (1988) Evolución racial de poblaciones *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Boletín Sanitario Vegetal Plagas** 14: 335–341.

TOKESHI H; GALLI F (1966) Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Wr) Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** 23: 195–209.

TOKESHI H; GALLI F; KUROZAWA C (1966) Nova raça de *Fusarium* do tomateiro em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** 23: 217- 227.

TOKESHI H; NOGUEZ MA (1974) Revisão da classificação da raça 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”** 21: 419–430.

URBEN AF (1994) Molecular and genetic structure of populations of *Fusarium oxysporum* (Schlechtend Ex Fries) f. sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder and Hansen and f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis and Shoemaker. Thesis (PhD) – University of Birmingham, UK. 194pp.

VALENZUELA-URETA JG; LAWN DA; HEISEY RF; ZAMUDIO-GUZMAN V (1996) First report of Fusarium wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in México. **Plant Disease** 80: 105.

VAN DER DOES HC; LIEVENS B; CLAES L; HOUTERMAN PM; CORNELISSEN BJC; REP M (2008) The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. **Environmental Microbiology** 10: 1475–1485.

VOLIN RB; JONES JP (1982) A new race of Fusarium wilt of tomato in Florida and sources of resistance. **Proceedings of Florida State Horticultural Society** 95: 268–270.

Tabela 1 – Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) obtidos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e pertencentes à coleção de fungos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças. A caracterização de isolados foi conduzida analisando os seguintes aspectos: **(1)** capacidade de infecção de um conjunto de acessos diferenciais para raças fisiológicas de Fol após inoculações controladas; **(2)** padrão de amplicons usando o sistema de marcadores moleculares desenvolvido por Hirano & Arie (2006); **(3)** padrão de amplicons utilizando um sistema de marcadores para sete genes da série *SIX* (*secreted in xylem*) e **(4)** análise do padrão de um amplicon RAPD polimórfico (OP-Z4; identificado entre *bulks* de raças de Fol) que foi convertido para um marcador do sistema SCAR (R2BR).

Código Isolado	Local de isolamento	Ano	Espécie ^a	Raça/f. sp. ^a	Sistema de Hirano & Arie (2006)					Sistema de marcadores para genes da série <i>SIX</i> (<i>secreted in xylem</i>)							R2BR OP-Z4 SCAR
					Uni	Sp13	Sp23	Spr1	Raça/f. sp.	<i>SIX1</i>	<i>SIX2</i>	<i>SIX3</i>	<i>SIX4</i>	<i>SIX5</i>	<i>SIX6</i>	<i>SIX7</i>	
Fus 022	SP	1989	Fol	For1?	+	-	-	+	For1	-	-	-	-	-	-	-	-
Fus 023	PE	1990	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	-	+	+	+
Fus 024	PE	1991	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	-	+	+	+
Fus 025	PE	1991	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	-	+	+	+
Fus 026	PE	1991	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 027	SP	1992	Fol	1	+	+	-	-	1	+	+	-	+	+	+	+	-
Fus 028	SP	1992	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 029	MG	1992	Fol	1	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 030	MG	1992	Fol	1	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 087	PE	2002	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 088	PE	2002	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 089	ES	2003	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 090	ES	2003	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 094	ES	2004	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 098	IMI/UK	*	Fol	1	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 099	USA	*	Fol	1	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 100	Tanzânia	*	Fol	1	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 101	USA	*	Fol	1	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 102	N. Zelândia	*	Fol	1	+	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 103	USA	*	Fol	2	+	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 104	USA	*	Fol	2	+	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 105	Austrália	*	Fol	1	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 106	Austrália	*	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 112	ES	2004	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	-
Fus 118	ES	2005	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	-

Fus 119	ES	2005	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	-	-	+	+	+
Fus 143	ES	2005	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 145	ES	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 146	ES	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 148	ES	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 149	ES	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 150	RJ	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 152	RJ	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 153	RJ	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 154	RJ	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 155	RJ	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 156	RJ	2006	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 167	DF	2007	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 168	DF	2007	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 169	DF	2007	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 175	RJ	2008	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 176	RJ	2008	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 177	**	2007	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 179	RJ	2009	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 180	RJ	2009	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 181	ES	2009	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 182	ES	2009	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 183	ES	2009	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 188	ES	2009	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 189	ES	2009	Fol	Forl?	+	-	-	+	Forl	+	+	-	-	-	-	-
Fus 190	ES	2009	Fol	Forl?	+	-	-	+	Forl	+	+	-	-	-	-	-
Fus 191	DF	2009	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 192	DF	2009	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 204	ES	2010	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	-
Fus 216	DF	2010	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	-
Fus 228	BA	2011	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 229	BA	2011	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+
Fus 230	BA	2011	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 232	BA	2011	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 233	BA	2011	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 234	BA	2011	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 235	DF	2011	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 256	MG	2012	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 257	BA	2012	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 258	DF	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+
Fus 259	RJ	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	-	-	+	+	+
Fus 260	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	-	-	+	+	-
Fus 261	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	-	-	+	+	+

Fus 289	CE	2012	Fol	Forl?	+	-	-	+	Forl	+	+	-	-	+	+	-	-
Fus 290	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	-	+
Fus 291	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 292	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 293	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	+	-	+	+	-
Fus 294	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	-	+	+	+
Fus 295	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 296	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 297	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 298	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 299	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 300	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Fus 301	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 302	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 303	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	+	+	+	+	+
Fus 304	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 305	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 306	PE	1997	Fol	2	+	+	-	-	1	+	+	+	-	+	+	+	+
Fus 307	ES	2012	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 308	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 309	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 310	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 311	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 312	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 313	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 314	MG	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 315	MG	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 316	RJ	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 317	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 318	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 319	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 320	RJ	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 321	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 322	RJ	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 323	RJ	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 324	RJ	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 325	ES	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 326	MG	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 327	RJ	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 328	RJ	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 329	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 330	MG	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	-	-	+	+	+	-
Fus 331	RJ	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	-

Fus 332	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 333	ES	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 334	RJ	2014	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 335	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	-	-	+	+	+	-
Fus 336	ES	2012	Fol	3	+	+	+	-	3	+	+	+	-	+	+	+	-
Fus 337	ES	2013	Fol	3	+	+	+	-	3	-	-	-	-	+	+	+	-
Fus 63K	Canadá	*	Forl	Forl	+	-	-	+	Forl	-	-	-	-	-	-	-	+
Fus 66K	Crete	*	Forl	Forl	+	-	-	+	Forl	-	-	-	-	-	-	-	+
Fus 107	GO	2004	Foc	NIT	-	-	-	-	NIT	-	-	-	-	-	-	-	+
Fus 108	GO	2004	Focep	NIT	-	-	-	-	NIT	-	-	-	-	-	-	-	-
Fus 110	AL	2004	Foc	NIT	-	-	-	-	NIT	-	-	-	-	-	-	-	+
Fus 166	PE	2007	Fot	NIT	-	-	-	-	NIT	-	-	-	-	-	-	-	-
Fus 194	MA	2009	Fov	NIT	-	-	-	-	NIT	-	-	-	-	-	-	-	-
Fus 207	SP	2010	Folac	NIT	*	*	*	*	NIT	-	-	-	-	-	-	-	-

(*). Desconhecido; (**). Obtido de semente comercial plaqueada em meio de cultura; (+) amplicon presente; (-) amplicon ausente.

^a Espécie e raça determinadas por testes de virulência.

^b Raça definida por caracterização molecular com os *primers* definidos por Hirano e Arie (2006).

NIT = Não infecta tomateiro

Fol = *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Forl = *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Focep = *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

Fot = *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

Fov = *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Foc = *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Tabela 2 – Relação gene-a-gene entre raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e genótipos de tomateiro e do acesso da espécie selvagem *Solanum pennellii* ‘LA 716’).

Raças (Genes de Avirulência)	Genótipos de tomateiro (Genes de Resistência)				
	Ponderosa (<i>i</i> ; <i>i</i> 2; <i>i</i> 3)	Viradoro (<i>I</i> ; <i>i</i> 2; <i>i</i> 3)	Floradade (<i>I</i> *; <i>I</i> 2; <i>i</i> 3)	BHRS-2,3 (<i>I</i> *; <i>I</i> 2*; <i>I</i> 3)	<i>S. pennellii</i> (<i>I</i> *; <i>I</i> 2; <i>I</i> 3)
1 (<i>Avr1</i> - SIX4)	S	R	R	R	R
2 (<i>Avr2</i> - SIX3)	S	S	R	R	R
3 (<i>Avr3</i> - SIX1)	S	S	S	R	R

*Não está confirmada a presença desses genes nos genótipos citados.

R = Resistência

S = Suscetibilidade

Tabela 3 – Primers específicos utilizados para identificação e caracterização molecular de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Primer	Sequência 5' – 3'	Amplicon esperado (pares de base)	Referência
Uni F	ATCATCTTGTGCCAACTTCAG	670 ~ 672	Hirano & Arie (2006)
Uni R	GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA		
Sp13 F	GTCAGTCCATTGGCTCTCTC	445	“
Sp13 R	TCCTTGACACCATCACAGAG		
Sp23 F	CCTCTGTCTTTGTCTCACGA	518	“
Sp23 R	GCAACAGGTCGTGGGGAAAA		
Spr1 F	GATGGTGGAACGGTATGACC	947	“
Spr1 R	CCATCACACAAGAACACAGGA		
P12-F2B (SIX1)	GTATCCCTCCGATTTTGAGC	992	Rep <i>et al.</i> (2004)
P12-R1 (SIX1)	AATAGAGCCTGCAAAGCATG		
SIX2-F2	CAACGCCGTTTGAATAAGCA	749	van der Does <i>et al.</i> (2008)
SIX2-R2	TCTATCCGCTTCTCTCTC		
SIX3-F1	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT	608	“
SIX3-R2	GGCAATTAACCACTCTGCC		
SIX4-F1	TCAGGCTTCACTTAGCATAAC	967	Lievens <i>et al.</i> (2009)
SIX4-R1	GCCGACCGAAAAACCCTAA		
SIX5-F1	ACACGCTCTACTACTCTCA	667	“
SIX5-R1	GAAAACCTCAACGCGGCAAA		
SIX6-F1	CTCTCCTGAACCATCAACTT	793	“
SIX6-R1	CAAGACCAGGTGTAGGCATT		
SIX7-F1	CATCTTTTCGCCGACTTGGT	862	“
SIX7-R1	CTTAGCACCCCTTGAGTAAC		

Tabela 4 – *Primers* RAPD que se mostraram polimórficos entre isolados das três raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

<i>Primers Operon</i> [®]							
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPM-07	CCGTGACTCA	OPQ-15	GGGTAACGTG	OPU-18	GAGGTCCACA
OPA-04	AATCGGGCTG	OPM-09	GTCTTGCGGA	OPQ-18	AGGCTGGGTG	OPU-19	GTCAGTGCGG
OPA-08	GTGACGTAGG	OPM-14	AGGGTCGTTC	OPQ-19	CCCCCTATCA	OPV-12	ACCCCCACT
OPA-18	AGGTGACCGT	OPN-09	TGCCGGCTTG	OPR-01	TGCGGGTCCT	OPX-04	CCGCTACCGA
OPA-20	GTTGCGATCC	OPO-06	CCACGGGAAG	OPR-03	ACACAGAGGG	OPX-12	TCGCCAGCCA
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPO-16	TCGGCGGTTC	OPR-16	CTCTGCGCGT	OPV-20	CAGCATGGTC
OPB-07	GGTGACGCAG	OPO-20	ACACACGCTG	OPR-17	CCGTACGTAG	OPX-06	ACGCCAGAGG
OPG-13	CTCTCCGCCA	OPP-01	GTAGCACTCC	OPR-19	CCTCCTCATC	OPX-16	CTCTGTTCCGG
OPK-11	AATGCCCCAG	OPP-09	GTGGTCCGCA	OPS-01	CTACTGCGCT	OPX-17	GACACGGACC
OPL-01	GGCATGACCT	OPP-10	TCCCGCTAC	OPS-02	CCTCTGACTG	OPX-18	GACTAGGTGG
OPL-02	TGGGCGTCAA	OPP-20	GACCCTAGTC	OPS-18	CTGGCGAACT	OPX-20	CCCAGCTAGA
OPL-03	CCAGCAGCTT	OPQ-02	TCTGTCGGTC	OPT-17	CCAACGTCGT	OPY-03	ACAGCCTGCT
OPL-11	ACGATGAGCC	OPQ-03	GGTACCTCA	OPT-19	GTCCGTATGG	OPY-05	GGCTGCGACA
OPL-17	AGCCTGAGCC	OPQ-06	GAGCGCCTTG	OPU-07	CCTGTCATC	OPY-08	AGGCAGAGCA
OPM-02	ACAACGCCTC	OPQ-07	CCCCGATGGT	OPU-10	ACCTCGGCAC	OPZ-04	AGGCTGTGCT

Figura 1 – Reação de genótipos de tomateiro ao isolado da raça 3 de *Fusarium oxysporum* f.



sp. lycopersici coletado em Coimbra–MG (Fus 256). Plantas mortas de ‘Ponderosa’, ‘Viradoro’ e ‘Floradade’ (suscetíveis a raça 3) e plantas assintomáticas de ‘BHR5-2,3’ (resistente as 3 raças de Fol). A última linha é constituída por plantas não inoculadas (controles negativos).

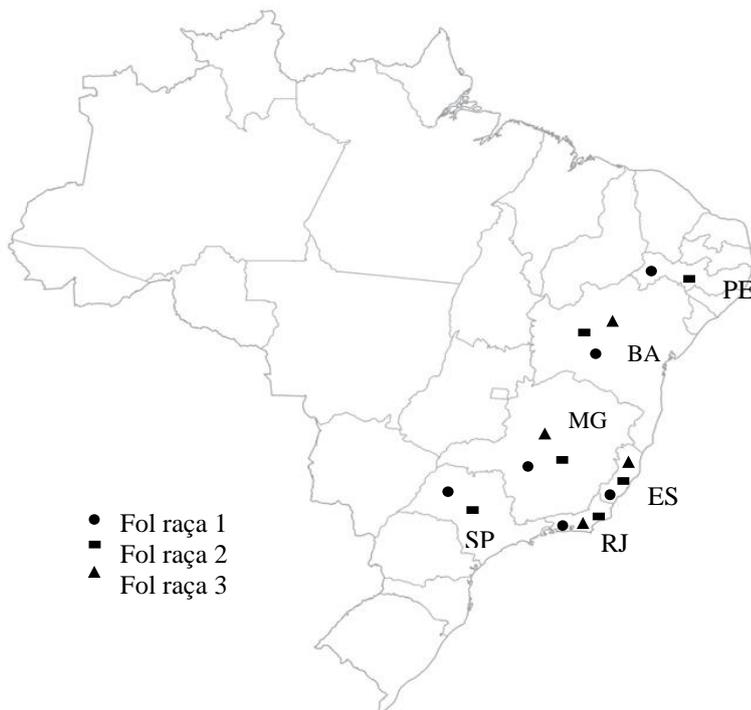


Figura 2 – Distribuição geográfica dos isolados das três raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtidos em diferentes regiões produtoras de tomate no Brasil.

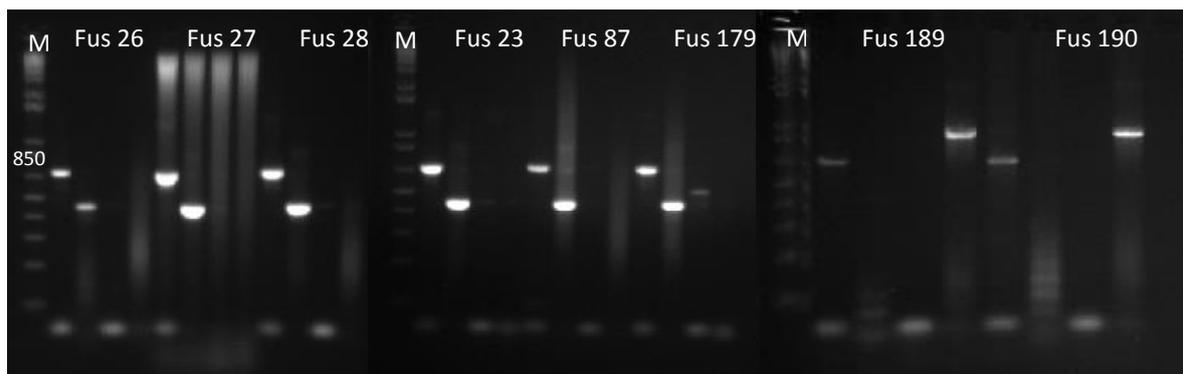


Figura 3 – Padrão de amplicons de isolados brasileiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) para o conjunto de *primers* Uni, Sp13, Sp23 e Spr1 (primeira, segunda, terceira e quarta linha de corrida para cada isolado, respectivamente). O protocolo de PCR foi idêntico ao descrito por Hirano & Arie (2006). A figura ilustra o perfil de amplicons obtido para os isolados Fus 26 (Fol raça 2), Fus 27 (Fol raça 1), Fus 28 (Fol raça 2); Fus 23 (Fol raça 2), Fus 87 (Fol raça 2), Fus 179 (Fol raça 3); Fus 189 e Fus 190 (dois presumíveis isolados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*). M = Marcador 1 Kb Plus.

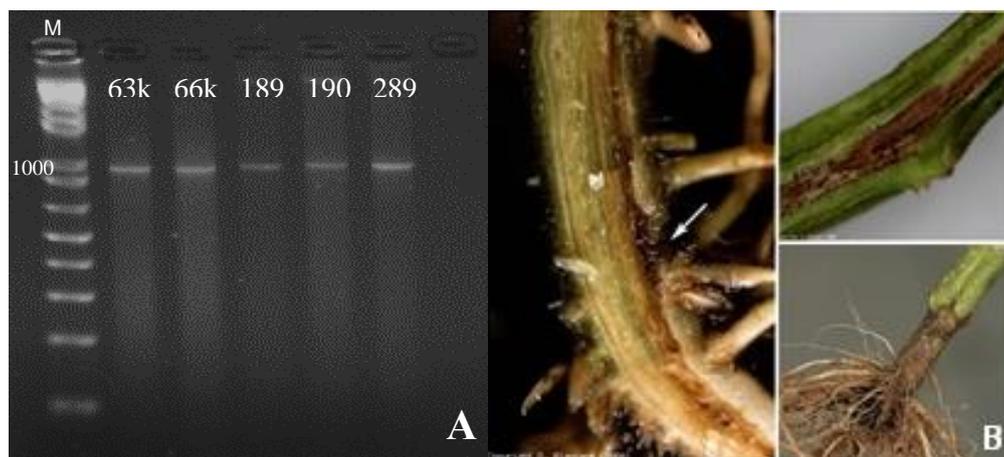


Figura 4 – (A) Padrão de amplicon (aproximadamente 947 bp) positivo para o *primer* Spr1 observado para os isolados 63k e 66k (isolados referência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* – Forl) e para os isolados Fus 189, Fus 190 e Fus 289 (presumíveis isolados brasileiros de Forl). M = Marcador 1Kb Plus. (B) Sintoma de podridão de colo e escurecimento radicular induzido por Forl (Foto: D Blancard – INRA).

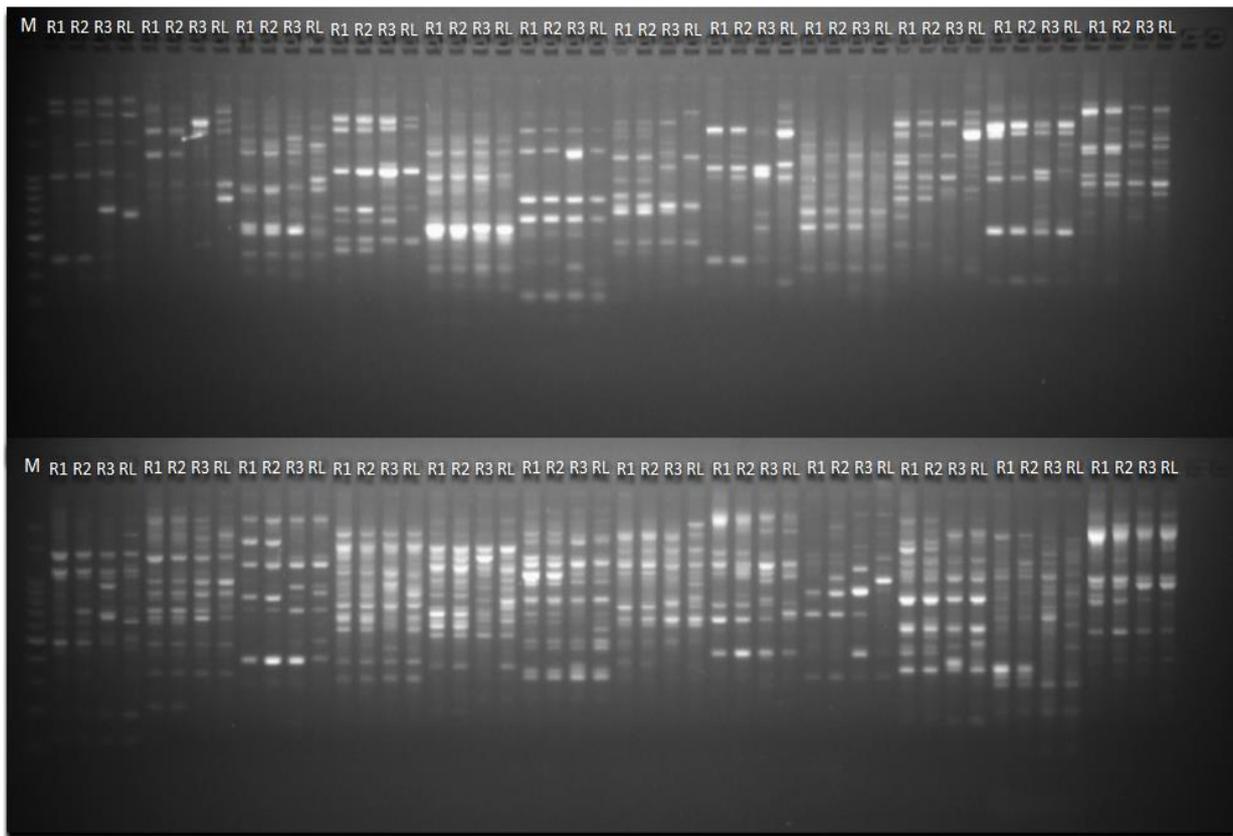


Figura 5 – Géis de agarose (1,5%) ilustrando os padrões de amplicons obtidos via *primers* RAPD com os *bulks* de DNA genômico correspondendo a uma mescla de isolados das três raças *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) e de presumíveis isolados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl). As colunas representam os *bulks* formados por DNA genômico extraído de isolados das diferentes raças de Fol: R1 = *bulk* de isolados da raça 1; R2 = *bulk* de isolados da raça 2; R3 = *bulk* de isolados da raça 3; e RL = *bulk* de presumíveis isolados de Forl. Cada grupo de quatro linhas de corrida (de R1 até RL) representa o resultado obtido com um dado *primer*. M = Marcador molecular 1 Kb Plus.

hypothetical protein FOWG_17988 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* MN25]
Sequence ID: [gb|EWZ77620.1](#) Length: 558 Number of Matches: 1

Range 1: 167 to 323 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
191 bits(484)	2e-55	Compositional matrix adjust.	99/157(63%)	120/157(76%)	0/157(0%)	+3
Query 159	CHSSLRGFSLAAYQGCVALGLLIAALNVYAVDKRTDISAYRWLVGRQFIWPAVLAIIVSM				338	
Sbjct 167	CHSSLRG+ +A YQGCVALGLL+A Y V + TDISAYR LV QFIWP +LAI V+ CHSSLRGYLIAGYQGCVALGLLVATSIAYLVGRDITDISAYRCLVACQFIWPILLAIGVTF				226	
Query 339	IPESPRHLVNI GRNEEAYralirlraprprDKSDIRRVQIELSEIYLSHEVGLGPEKVAF				518	
Sbjct 227	+PESPRHLVN+GRNEEAY AL RLR P+P+ + + +RV +ELSEIY SHE GLGPE+V+V+ LPESPRHLVNMGRNEEAYTALDRLRNPKPQSELNKQRVGMELSEIYFSHETGLGPERVVF				286	
Query 519	RKVAKGWLSTRSSGITRSVNLVIHPLTVSVLLHTMYQ		629			
Sbjct 287	R++ K W R GI R+ + IHPL+ SV LHTMYQ RELVKWF CARVKGIARTPHRRIHPLSFSVFLHTMYQ		323			

Figura 6 – Resultado de BLASTX do alinhamento do polipeptídeo traduzido da região amplificada pelo RAPD/SCAR OP-Z4 (denominado como R2BR) que apresentou elevados níveis de identidade com uma região do genoma de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* contendo fatores do tipo "MFS" (GenBank EWZ7762). A região MFS ou “Major Facilitator Superfamily” é uma grande família gênica e de ampla ocorrência taxonômica que codifica proteínas que facilitam o transporte entre membranas internas no citoplasma de íons, açúcares, fosfatos, drogas, neurotransmissores, nucleosídeos, aminoácidos e peptídeos (Ma *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 3

Busca via *bulked segregant analysis* de marcadores ligados a fatores de resistência a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1 (gene *I*) e raça 3 (gene *I-7*)

Busca via *bulked segregant analysis* de marcadores ligados a fatores de resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1 (gene *I*) e raça 3 (gene *I-7*)

RESUMO – O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil. O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) é agente causal de uma das mais importantes doenças da cultura, a murcha de fusário. Os controles químicos e culturais são onerosos e pouco efetivos na maioria das situações, sendo assim, a utilização de variedades resistentes é a melhor alternativa para o controle desta doença. O gene *I* (= *Immunity*) foi um dos primeiros genes de resistência a doenças a ser caracterizado no tomateiro. O gene confere níveis elevados de resistência exclusivamente contra isolados de Fol raça 1. Por sua vez, a resistência a raça 3 de Fol foi identificada em acessos de *S. pennellii* e caracterizada como monogênica dominante (gene *I-3*). O gene do acesso *S. pennellii* ‘PI 414773’ foi tentativamente denominado. Os genes *I* e *I-7* ainda não foram clonados e são poucos os marcadores moleculares disponíveis para monitorar a incorporação desses fatores. Neste contexto, foram realizados cruzamentos entre os genótipos ‘Ponderosa’ (suscetível as três raças), ‘Viradoro’ (resistente a raça 1 devido a presença do gene *I*) e ‘LAM 205’ (resistente a raça 3 devido a presença do gene *I-7*). Três populações segregando para os loci *I* e *I-7* (individualmente ou em conjunto) foram obtidas. Essas populações foram caracterizadas quanto a resistência a Fol por meio de inoculação por imersão de raízes separadamente com isolados das raças 1 e 3 do patógeno. Para a identificação de marcadores moleculares associados à resistência a Fol foi utilizada a estratégia de RAPD combinada com ‘*Bulked segregant analysis*’ (BSA). Uma coleção de 520 *primers* RAPD foi empregada inicialmente para buscar polimorfismos entre os parentais e uma combinação equimolar de DNA genômico extraído de indivíduos F₂ resistentes (= *bulk R*) e indivíduos F₂ suscetíveis (= *bulk S*). Foram inicialmente observados polimorfismos entre os parentais ‘Ponderosa’, ‘Viradoro’ e ‘LAM 205’ com 60 *primers*. Deste grupo inicial, apenas 24 marcadores polimórficos se mostraram estáveis. Amostras da população F₂ foram avaliadas para confirmar de ligação entre os amplicons polimórficos e a resistência aos isolados de Fol raça 1 ou raça 3 controlada pelos diferentes fatores. No entanto, a técnica de RAPD, utilizada para a busca de marcadores ligados a genes de resistência a Fol, não possibilitou encontrar marcadores polimórficos com estreita ligação para esses fatores de resistência. Desta forma, os polimorfismos encontrados no presente trabalho podem servir como um banco de dados da variabilidade genética entre os genótipos avaliados para ser utilizado pelos programas de melhoramento na busca de ligação com outras características de interesse e que se mostram contrastantes entre os três parentais empregados no presente estudo.

Palavras-chave: Resistência genética, murcha de fusário, marcadores moleculares, melhoramento, tomateiro.

Search for molecular markers linked with resistance factors to *Fusarium*

***oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 (gene *I*) and race 3 (gene *I-7*) via bulked segregant analysis**

ABSTRACT – The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the main vegetables crops in Brazil. The fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) is the causal agent of one of the most important diseases of this crop, the *Fusarium* wilt. The chemical and cultural controls are expensive and not effective in most situations, therefore, the use of resistant cultivars is the best option to control this disease. The gene *I* (= Immunity) was one of the first disease resistance factors characterized in tomato. This gene confers high levels of resistance exclusively against Fol race 1 isolates. The resistance to Fol race 3 was identified in *S. pennellii* accessions ‘PI 414773’ and ‘LA716’ (the original source of the gene *I-3*) and characterized as dominant monogenic. The gene of *S. pennellii* ‘PI 414773’ was tentatively named as *I-7*. The genes *I* and *I-7* have not yet been cloned and there are few molecular markers available to monitor the incorporation of these two factors. In this context, crosses were made among the genotypes ‘Ponderosa’ (susceptible to all three races), ‘Viradoro’ (resistant to race 1 isolates due to the presence of the gene *I*) and ‘LAM 205’ (resistant to race 3 isolates due to the presence of the gene *I-7*). Three populations were obtained segregating for loci *I-7* and *I* individually or simultaneously. These populations were characterized as resistance to Fol by root dip inoculation technique separately with races 1 and 3 isolates. For the identification of molecular markers linked to resistance to Fol it was used RAPD strategy combined with “bulk segregant analysis” (BSA). A collection of 520 RAPD primers was employed initially to search for polymorphisms between parental lines and with an equimolar combination of genomic DNA extracted from resistant F₂ individuals (= R bulk) and susceptible F₂ individuals (= S bulk). Polymorphisms among the parental lines ‘Ponderosa’, ‘Viradoro’ and ‘LAM 205’ were initially detected with 60 RAPD primers. From this initial set of potential markers, only 24 polymorphisms were found to be stable. Samples of individuals from the F₂ population were assessed to confirm the linkage between each polymorphism and the segregating resistance factor against either Fol race 1 or race 3 isolates. However, the RAPD screening was not able to detect stable polymorphic markers with close linkage with these two resistance factors. Thus, the polymorphisms found in this study may serve only as a database of genetic variability among genotypes for future linkage studies with other features/traits of interest for breeding programs.

Key words: genetic resistance, fusarium wilt, molecular markers, breeding, tomato.

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, sua produção está sujeita a um amplo espectro de patógenos, dentre eles fungos, bactérias, nematoides e vírus (Boiteux *et al.*, 2012). O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) é agente causal de uma das mais importantes doenças da cultura, a murcha de fusário, que infecta tanto espécies cultivadas como selvagens de tomateiro. Estratégias de controle químico e culturais são onerosas e pouco efetivas na maioria das situações (Jones & Woltz, 1981). A utilização de híbridos resistentes tem sido a melhor e, em algumas situações, a única alternativa economicamente viável para o controle desta doença.

Diferentes fatores de resistência a Fol foram identificados e caracterizados em espécies de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) e incorporados em germoplasma comercial (Huang & Lindhout, 1997; Singh, 2006; Boiteux *et al.*, 2012; **Tabela 1**). O primeiro gene de resistência a Fol foi identificado por Bonh & Tucker (1939) e foi denominado de *I* (= *Immunity*). Esse gene confere resistência exclusivamente contra isolados da raça 1 (**Tabela 1**). Após o aparecimento seguido da ampla disseminação da raça 2, um outro gene de resistência foi identificado e denominado *I-2* (Alexander & Tucker, 1945; **Tabela 1**). Tanto o gene *I* quanto o gene *I-2* foram identificados em acessos da espécie selvagem *S. pimpinellifolium* e estão localizados no cromossomo 11 do tomateiro (Paddock, 1950; Stall & Walter, 1965) A resistência à raça 3 de Fol foi identificada nos acessos de *S. pennellii* ‘PI 414773’ e ‘LA716’ e caracterizada como monogênica dominante (McGrath *et al.*, 1987; Scott & Jones, 1989). Todos os acessos de *S. pennellii* avaliados até o presente momento possuem resistência às três raças de Fol (Scott & Jones, 1990; Reis *et al.*, 2004). Além disso, novas fontes de resistência também foram identificadas, mas ainda não inteiramente caracterizadas no ponto de vista genético, em acessos de *S. habrochaites* (= *Lycopersicon hirsutum*), *S. chilense* e *S. peruvianum* (Reis *et al.*, 2004).

Lim *et al.* (2006) identificaram que a resistência a raça 3 do patógeno está ligada a dois

fatores diferentes, um advindo de *S. pennellii* 'LA716' (denominado como *I-3*) e outro de *S. pennellii* 'PI 414773' que foi tentativamente denominado como *I-7* (**Tabela 1**), cuja localização cromossômica ainda não está elucidada. Testes de alelismo demonstraram que a resistência às raças 1 e 2 condicionada por *S. pennellii* não é alélica a *I* e *I-2* incorporados em *S. lycopersicum* a partir de acessos de *S. pimpinellifolium* (Bournival *et al.*, 1990). De fato, alguns isolados da raça 1 de Fol são capazes de superar os genes de resistência *I-2* e *I-3*, enquanto que o gene *I-3* confere uma redução na susceptibilidade a raça 2. Isso evidencia que *I-3* possui uma ação que interfere com isolados das raças 2 e 3, mas não confere resistência contra isolados da raça 1 de Fol (Scott *et al.*, 2004).

Os genes *I* e *I-2* têm sido os dois genes mais amplamente incorporados em cultivares de tomateiro. Atualmente, é difícil encontrar alguma moderna cultivar sem a presença desses genes, especialmente o gene *I* (Scott & Gardner, 2006). No entanto, não existem ainda muitas cultivares disponíveis no mercado com resistência a raça 3 do patógeno. A Embrapa Hortaliças lançou recentemente o híbrido 'BRS Imigrante' que apresenta resistência múltipla às três raças de Fol e ainda apresenta tolerância às principais espécies de begomovírus (= geminivírus) (Embrapa Hortaliças, 2014).

O desenvolvimento de marcadores ligados a genes/fatores de resistência tem sido bastante utilizado para o acompanhamento e seleção durante o desenvolvimento de linhagens e variedades multi-resistentes a doenças (Kim *et al.*, 2011). No entanto, o monitoramento via marcadores moleculares desses diferentes fatores de resistência ao Fol oriundos dessas diferentes fontes ainda não está totalmente estabelecido. Os genes *I-2* e *I-3* já estão clonados (**Tabela 1**) e eficientes sistemas de marcadores já estão disponíveis para monitorar a incorporação desses fatores durante o processo de melhoramento. No entanto, esses sistemas ainda não estão disponíveis para monitorar os genes *I* e *I-7*. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores moleculares ligados aos fatores *I* e *I-7* que

controlam resistência a isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1 e raça 3, respectivamente. A estratégia empregada para identificação de marcadores moleculares ligados aos fatores *I* e *I-7* foi a combinação do sistema de marcadores RAPD com o sistema de ‘*Bulked segregant analysis*’ (BSA) proposto por Michelmore *et al.* (1991) onde “isolinhas”, variando apenas para um dado locus ou região genômica contrastante, são produzidas *in vitro* usando bulks de indivíduos já da geração F₂ (ver esquema na **Figura 1**). O presente trabalho foi conduzido via análise de indivíduos F₂ populações segregantes para os dois fatores de resistência (*I* e *I-7*). O principal objetivo dessa ação de pesquisa foi estabelecer uma plataforma confiável de seleção assistida para esses dois importantes fatores de resistência, devido a falta de informações na literatura a respeito desses loci, *I* e *I-7*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de populações segregantes para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raças 1 e 3 – Foram realizados cruzamentos entre os genótipos ‘Ponderosa’ (suscetível as três raças), ‘Viradoro’ (resistente a raça 1) e a linhagem ‘LAM 205’ (resistente a raça 3), gerando três populações segregantes: ‘Ponderosa’ x ‘Viradoro’; ‘Ponderosa’ x ‘LAM 205’; ‘Viradoro’ x ‘LAM 205’. As sementes F₁ (heterozigotas R) foram plantadas e autofecundadas para a obtenção da população F₂ (segregante).

Caracterização da população F₂ (segregante) em casa de vegetação – Sementes F₂ (resultantes da autofecundação F₁) foram semeadas em bandejas de 128 células contendo substrato esterilizado (Plantmax[®]) e mantidas em casa de vegetação em condições de temperatura ambiente e com duas irrigações diárias (uma pela manhã e outra pela tarde). Após 21 dias do plantio (DAP) as mudas foram removidas e as raízes lavadas para remover o substrato aderido às mesmas. A porção apical das raízes foi cortada (aproximadamente 2 cm) e

as raízes mergulhadas em suspensão de esporos por 3 min. Em seguida foram transplantadas para vasos de 1L contendo uma mistura de argila, esterco bovino, areia e palha de arroz carbonizada esterilizada. Foram adicionados 5 mL da suspensão de conídios no colo de cada plântula após o transplante. Para produção do inóculo foi utilizado um isolado da raça 1 de Fol (denominado Fus 27, ver **Tabela 1, capítulo 2**) e um da raça 3 (denominado Fus 256, ver **Tabela 1, capítulo 2**), cultivado em meio BD por 7 dias, sob 12 horas de luz e temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$). Após este período a suspensão foi filtrada em gaze dupla e a concentração ajustada para 1×10^6 (conídios/ μL), com o auxílio de um hemacitômetro. A avaliação foi feita 21 dias após a inoculação usando uma escala de notas variando de 1 a 5, adaptada de Santos (1999), sendo 1 = plantas sem sintomas; 2 = plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; 3 = plantas com escurecimento vascular intenso e com início de murcha ou amarelecimento foliar; 4 = plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; 5 = plantas mortas. Com base nas notas recebidas às plantas foram classificadas em resistentes ($R < 3$) e suscetíveis ($S \geq 3$).

Busca de marcadores RAPD ligados aos fatores de resistência ao Fol via *bulked segregant analysis* (BSA) – Para a identificação de marcadores moleculares ligados a resistência, o DNA genômico extraído dos genótipos parentais e uma combinação equimolar de DNA genômico extraído de cinco indivíduos F_2 resistentes (= *bulk R*) e cinco indivíduos F_2 suscetíveis (= *bulk S*) foi avaliado, via a estratégia de RAPD combinada com ‘*Bulked segregant analysis*’ (BSA) (Michelmore *et al.*, 1991). Essas análises foram conduzidas empregando uma coleção de 520 *primers* RAPD (Operon, California, EUA). A reação com os *primers* RAPD foi composta de 2 μL de DNA genômico (20 ng/ μL), 1,25 μL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,5 μL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase (5U/ l), 2 μL de *primer*, 5,95 μL de H_2O Milli-Q com volume total de 12,5 μL . O

programa utilizado para amplificação dos fragmentos consistiu de um ciclo inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 36°C por 1 minuto, e 72°C por 1.5 minuto, e ciclo final a 68° por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Validação dos marcadores RAPD polimórficos entre os parentais com uma amostra da população segregante (F₂) – Ao confirmar um polimorfismo entre os parentais contrastantes e também nos bulks, uma amostra da população F₂ foi testada para confirmar o polimorfismo entre os indivíduos considerados resistentes e suscetíveis e sua ligação com o gene de resistência a Fol. Os amplicons polimórficos entre os bulks foram validados com uma amostra mais ampla da população F₂. Amplicons estáveis foram removidos do gel de agarose sob luz ultravioleta e purificados utilizando o Kit Invitex Life Technologies® e clonados utilizando o kit pGEM®-T (Promega), seguindo as condições recomendadas pelo fabricante.

Purificação de amplicons RAPD polimórficos – Os marcadores RAPD mais estáveis, tiveram seus amplicons polimórficos extraídos do gel de agarose e purificados. Para a purificação das bandas foi utilizado o *Kit Invitrogen PureLink® (Quick Gel Extraction Kit)*, seguindo as recomendações do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de populações segregantes para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raças 1 e 3 – Foram obtidas três populações F₂ com diferentes características para a resistência a Fol, uma segregando para o locus *I*, uma para os dois loci *I* e *I-7* e outra para o locus *I-7*. A cultivar Ponderosa é uma variedade livre de qualquer introdução/introgressão gênica para resistência, o que explica a susceptibilidade desse acesso maioria dos patógenos. É

bastante utilizada como controle suscetível nos testes de virulência. A cultivar Viradoro é uma cultivar de tomate para processamento industrial, indicada para plantio nas principais regiões produtoras de tomate, resistente diferentes espécies de *Tospovirus* (devido a presença do gene *Sw-5*), à mancha-de-estenflilio (*Stemphylium solani*), à murcha de fusário (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1) e ao nematóide-das-galhas (*Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*), desenvolvida em trabalho cooperativo entre a Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA e a Embrapa Hortaliças (Giordano *et al.*, 2000). ‘LAM 205’ é a linhagem parental do híbrido ‘BRS Imigrante’, que apresenta resistência a isolados de Fol raça 3 (Embrapa Hortaliças, 2014).

Caracterização das populações F₂ (segregantes) em casa de vegetação – As populações F₂ foram caracterizadas quanto à resistência a Fol: a população ‘Ponderosa’ x ‘Viradoro’ foi avaliada quanto a resistência a Fol raça 1 (Fus 27), e às populações ‘Viradoro’ x ‘LAM 205’ e ‘Ponderosa’ x ‘LAM 205’ quanto a Fol raça 3 (Fus 256). Devido ao caráter destrutivo da avaliação, as populações não puderam ser avaliadas para duas ou mais raças ao mesmo tempo, sendo necessário obter populações diferentes para cada avaliação de resistência. As plantas foram avaliadas seguindo uma escala de notas, e posteriormente classificadas em resistentes (R) e suscetíveis (S). A avaliação das populações F₂ pode ser observada na **Tabela 2**. Todas as populações caracterizadas demonstraram o caráter monogênico dominante de resistência a Fol, como indicado pelos valores do teste de Qui-quadrado.

Busca de marcadores do tipo RAPD para monitoramento dos loci de resistência – Foi observado polimorfismo inicial com 60 *primers* entre os parentais ‘Ponderosa’, ‘Viradoro’ e ‘LAM 205’ (**Tabela 3; Figura 2**). Foram observadas bandas específicas para o genótipo ‘Ponderosa’ nos *primers* OPA-11, OPM-17, OPP-17, OPY-2, OPW-4, OPW-18 e OPZ-16, e para o genótipo ‘Viradoro’ em OPA-11, OPM-18, OPN-20, OPQ-15, OPW-6. O acesso ‘LAM

205' foi o que apresentou menor quantidade de polimorfismo, e foram observadas bandas específicas apenas nos *primers* OPM-16 e OPZ-13. Estes *primers* polimórficos foram então testados nos bulks preparados com as plantas F₂, suscetíveis e resistentes, para cada população. Apenas 24 *primers*, permaneceram polimórficos entre os parentais e os *bulks* segregantes, assim uma amostra de cada população foi testada para comprovar a ligação entre o polimorfismo encontrado e a resistência a Fol.

Validação dos marcadores RAPD polimórficos entre os parentais com uma amostra da população segregante (F₂) – Foram selecionadas dez plantas suscetíveis e dez plantas resistentes de cada uma das três populações para comprovar a ligação entre o polimorfismo e a resistência a Fol. Alguns marcadores continuaram polimórficos entre os parentais, mas não se mostraram em ligação com a resistência quando avaliados nas plantas F₂ (**Figura 3**). Alguns *primers*, como o OPW-6 (**Figura 4**), não foram polimórficos nem entre os parentais, quando avaliados junto às plantas F₂. Esta característica de resultados diferentes dos iniciais quando repetidos é bastante comum para este tipo de marcador. Alguns desses marcadores estão no processo de clonagem visando identificar as sequências e a localização cromossômica desses amplicons no genoma do tomateiro (dados não apresentados).

A técnica de RAPD é uma importante ferramenta para estimar a variabilidade genética em bancos de germoplasma (Gonçalves *et al.*, 2008) e é bastante utilizada em estudos de similaridade genética em genótipos (Foolad *et al.*, 1993; Kulkarni & Deshpande, 2006; Sharifova *et al.*, 2013). Análises de polimorfismo de DNA com marcadores do tipo RAPD têm sido amplamente utilizadas na identificação e seleção eficiente de genótipos que carregam combinações específicas de genes de resistência. Marcadores desse tipo têm sido utilizados e identificados ligados a genes de resistência em várias culturas a diversos patógenos (Ferreira *et al.*, 1999), como café – *Colletotrichum kahawae* (Agwanda *et al.*, 1997) e arroz – *Pyricularia*

grisea (Araújo *et al.*, 2002). No tomate, vários genes de resistência foram identificados utilizando esta técnica, genes de resistência a *Phytophthora infestans*, *Ph-3* (Zou *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2013); a *Tomato mottle virus* – ToMov (Griffiths & Scott, 2001); *Cladosporium fulvum* – série gênica *Cf* (Wang *et al.*, 2007) e *Tomato mosaic virus* – *Tm-2* (Ohmori *et al.*, 1995).

Geralmente o marcador RAPD é dominante, no entanto, se ocorrerem inserções ou deleções em alguma região do marcador, ele pode ser co-dominante. Durante avaliação dos genótipos Ponderosa (S) e Viradoro (R) utilizando o *primer* OPR-4, foi observado um polimorfismo do tipo co-dominante (**Figura 4**), quando avaliado nas plantas F₂, no entanto, este polimorfismo também não foi correlacionado com a resistência a Fol. Apesar de ser um método simples, sua reprodutibilidade pode não ser tão satisfatória (Rajput *et al.*, 2006). Devido a esta característica e natureza dominante do RAPD esses marcadores necessitam ser convertidos em outros tipos de marcadores como do tipo SCAR (*sequence characterized amplified region*), ou CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*), em geral codominantes e mais confiáveis (Joshi *et al.*, 2013). Estes tipos de marcadores são mais estáveis e são minimamente afetados por condições de reação (Wang *et al.*, 2007).

Modificados para SCAR, estes marcadores podem, então, ser utilizados na seleção assistida por marcadores (MAS), que é uma ferramenta eficiente para a seleção de eventos de recombinação desejáveis para os genes de resistência aos patógenos (Robbins *et al.*, 2010; Truong *et al.*, 2013). Outro fator de extrema importância para o melhoramento é que a resistência a um determinado patógeno pode estar relacionada a outras características para o mesmo hospedeiro, como o aumento na susceptibilidade a outro patógeno. O gene de resistência a Fol raça 3 (*I-3*) está associado a tamanho de fruto pequeno e tem sido implicado em outras associações com outras características negativas. Esse locus contribui no aumento de até 20% da infecção em plantas *I-3/I-3* vs. plantas *i-3/i-3*, e em heterozigose geralmente resulta numa resposta de susceptibilidade intermediária à mancha-bacteriana causada pela raça T4 de

Xanthomonas perforans (Hutton *et al.*, 2014). Assim, quanto maior o número de características identificadas nos vários acessos de tomateiro, maior será a chance de monitorá-las durante as etapas de melhoramento.

Desta forma, embora polimorfismos tenham sido encontrados, o subgrupo avaliado não apresentou ligação estreita com nenhum dos dois fatores de resistência a Fol. Esses marcadores, no entanto, podem ser importantes no programa de melhoramento, pois podem estar relacionadas a outras características de interesse, formando um banco de dados da diversidade existente entre os genótipos de tomate avaliados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A técnica de RAPD, utilizada para a busca de marcadores ligados a genes de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, não possibilitou encontrar um grande número de polimorfismos estáveis em estreita ligação com os genes *I* e *I-7*;
- Análise de segregação indicou que o locus *I* não contribuiu para intensificar os níveis de resistência ou aumentar a frequência de indivíduos com a resistência à raça 3 em populações segregando simultaneamente para os genes *I* e *I-7*;
- Pelas respostas dos parentais contrastantes e de acordo com o ajuste genético aos modelos monogênicos dominantes, acredita-se que a fenotipagem das populações para as duas raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* foi adequada;
- Recomenda-se continuar explorando essa população em busca de marcadores empregando outros sistemas de marcadores mais robustos e capazes de gerar mais polimorfismos (por exemplo, o sistema de marcadores do tipo AFLP);
- Recomenda-se também analisar a resposta aos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de progênes F_3 originária de indivíduos F_2 resistentes e suscetíveis a fim de refinar a busca por marcadores tanto em associação como em repulsão com os genes *I* e *I-7*;
- Os polimorfismos RAPD encontrados entre os genótipos parentais avaliados: ('Ponderosa', 'Viradoro' e 'LAM 205') formam um banco de dados sobre a variabilidade genética desses acessos que pode ser utilizado nos programas de melhoramento na busca de ligação com outras características de interesse.

LITERATURA CITADA

AGWANDA CO; LASHERMES P; TROUSLOT P; COMBES MC; CHARRIER (1997) Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. **Euphytica** 97: 241–248.

ALEXANDER LJ, TUCKER CM (1945) Physiologic specialization in the tomato wilt fungus: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Agricultural Research** 70: 303–313.

ARAÚJO LG; PRABHU AS; FILIPPI MC (2002) Identification of RAPD maker linked to blast resistance gene in a somaclonal of rice cultivar Araguaia. **Fitopatologia Brasileira** 27: 181–185.

BOHN GW; TUCKER CM (1939) Immunity to *Fusarium* wilt in the tomato. **Science** 30: 603–604.

BOURNIVAL BL; VALLEJOS CE; SCOTT JW (1990) Genetic analysis of resistance to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* from the wild tomato *Lycopersicon pennellii*. **Theoretical and Applied Genetics** 79: 641–645.

BOITEUX LS; FONSECA MEN; SIMON PW (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA based genetic fingerprinting analyses in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 124: 32–38.

EMBRAPA HORTALIÇAS (2014) Cultivares da Embrapa Hortaliças (1981-2013).

FERREIRA CF; BORÉM A; CARVALHO GA; NIETSCH S; DE PAULA JÚNIOR TJ; BARROS EG; MOREIRA MA (1999) Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência a raça 63.39 da mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia** 58: 247–252.

FOOLAD MR; JONES RA; RODRIGUEZ RL (1993) RAPD markers for constructing intra-specific tomato genetic maps. **Plant Cell Reports** 12: 293–297.

GONÇALVES LSA; RODRIGUES R; SUDRÉ CP; BENTO CS; MOULIN MM; ARAÚJO ML; DAHER RF; PEREIRA TN; PEREIRA MG (2008) Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. **Horticultura Brasileira** 26: 364–370.

GRIFFITHS PD; SCOTT JW (2001) Inheritance and linkage of Tomato Mottle Virus resistance genes derived from *Lycopersicon chilense* accession LA 1932. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 126: 462–467.

HUTTON SF; SCOTT JW; VALLAD GE (2014) Association of the fusarium wilt race 3 resistance gene, *I-3*, on Chromosome 7 with increased susceptibility to bacterial spot race T4 in tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 139: 282–289.

JOSHI BK; PANTHEE DR; LOUWS FJ; YENCHO GC; SOSINSKI B; ARELLANO C (2013) RAPD markers linked to late blight resistance in tomato. **Nepal Journal of Science and Technology** 14: 1–14.

KIM HJ; LEE HR; HYUN JY; WON DC; HONG DO; CHO H; LEE KA; HER NH; LEE JH; HARN CH (2011) Application of disease resistance markers for developing elite tomato varieties and lines. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology** 29: 336–344.

KULKARNI M; DESHPANDE U (2006) RAPD based fingerprinting of tomato genotypes for identification of mutant and wild cherry specific markers. **Journal of Plant Sciences** 1: 192–200.

LIM GTT; WANG G-P; HEMMING MN; BASUKI S; McGRATH DJ; CARROLL BJ; JONES DA (2006) Mapping the *I-3* gene for resistance to *Fusarium* wilt in tomato: Application of an *I-3* marker in tomato improvement and progress towards the cloning of *I-3*. **Australasian Plant Pathology** 35: 671–680.

MICHELMORE RW; PARAN I; KESSELI RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 88: 9828–9832.

OHMORI T; MURATA M; MOTOYOSHI F (1995) Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in tomato. **Theoretical and Applied Genetics** 90: 307–311.

PADDOCK EF (1950) A tentative assignment of the *Fusarium*-immunity locus to linkage group 5 in tomato. **Genetics** 35: 683–684.

RAJPUT SG; WABLE KJ; SHARMA KM; KUBDE PD; MULAY SA (2006) Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in tomato. **African Journal of Biotechnology** 5: 108–112.

REIS A; GIORDANO LB; LOPES CA; BOITEUX LS (2004) Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germoplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 4: 495–502.

ROBBINS MD; PANTHEE DR; GARDNER RG; FRANCIS DM; STEVENS MR (2010) Marker-assisted selection for coupling phase resistance to *Tomato spotted wilt virus* and *Phytophthora infestans* (Late blight) in tomato. **HortScience** 45: 1424–1428.

SANTOS JRM (1999) Protocolo de tecnologia: seleção para resistência a doenças em Hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças; (Comunicado Técnico 11). 4pp.

SINGH RJ (2006) Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vegetables Crops, Vol 3. CRC Press.

SCOTT JW; JONES JP (1989) Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. **Euphytica** 40: 49–53.

SCOTT JW; AGRAMA HA; JONES JP (2004) RFLP-based analysis of recombination among resistance genes to *Fusarium* wilt races 1, 2 and 3 in tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 129: 394–400.

SCOTT JW; GARDNER RG (2006) Breeding for Resistance to fungal pathogens. In: RAZDAN MK; MATTOO AK (2006) Genetic improvement of Solanaceous crops: tomato. Vol 2

SHARIFOVA S; MEHDIYEVA S; THEODORIKAS K; ROUBOS K (2013) Assessment of genetic diversity in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes using RAPD primers. **Journal of Horticultural Research** 21: 83–89.

TRUONG HTH; TRAN HN; CHOI HS; PARK PH; LEE HE (2013) Development of a co-dominant SCAR marker linked to the *Ph-3* gene for *Phytophthora infestans* resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*). **European Journal of Plant Pathology** 136: 237–245.

WANG A; MENG F; XU X; WANG Y; LI J (2007) Development of molecular markers linked to *Cladosporium fulvum* resistant gene *Cf-6* in tomato by RAPD and SSR methods. **HortScience** 42: 11–15.

ZOU Q; LI H; ZHANG Z; LU S; WANG Y; YANG G; ZHANG; QIU Y (2012) Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker of *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato. **African Journal of Biotechnology** 11: 11372–11376.

Tabela 1 – Características e peculiaridades dos diferentes fatores de resistência identificados contra patógenos pertencentes ao grupo *Fusarium oxysporum* em *Solanum* (sect. *Lycopersicon*).

Símbolo do fator de resistência	Fontes de resistência, variantes patogênicas para os quais esses fatores funcionam, localização cromossômica e referências
<i>Flr</i>	Gene de resistência a isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> . Esse gene foi introgridido de <i>S. peruvianum</i> estando presente nos seguintes acessos: ‘PI 126944’, ‘PI 128650’ e ‘PI 126926’. <i>Frl</i> está localizado no cromossomo 9 e ligado com os genes/alelos <i>Tm-2/Tm-2</i> ² (Fazio <i>et al.</i> , 1999).
<i>I</i>	Gene de resistência contra isolados da raça 1 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Foi introgridido de <i>S. pimpinellifolium</i> (Bonh & Tucker, 1939). O fator de resistência está localizado no cromossomo 11 e ainda não foi clonado.
<i>I-2</i>	Gene resistência a isolados da raça 2 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Foi introgridido de <i>S. pimpinellifolium</i> ‘PI 126915’ (Alexander & Tucker, 1945). O segmento genômico portando o gene <i>I-2</i> já foi clonado e isolado (Simons <i>et al.</i> , 1998). Localização: cromossomo 11 (Panthee & Chen, 2010).
<i>I-3</i>	Gene de resistência a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3 introgridido a partir do acesso de <i>S. pennellii</i> ‘LA-716’. Localização: cromossomo 7 (Panthee & Chen, 2010). O gene foi isolado e classificado na família de genes “S-receptor-like kinase” (SRLK) constituindo uma nova classe de genes de resistência (Catanzariti <i>et al.</i> , 2015).
<i>I-4 = I-7</i>	Gene de resistência a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3 introgridido de <i>S. pennellii</i> ‘PI-414773’ (Panthee & Chen, 2010).

Tabela 2 – Análise genética de populações F₂ obtidas de cruzamentos entre genótipos de tomateiro suscetível ('Ponderosa') e resistentes ('Viradoro' e 'LAM 205') após inoculação com duas raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

População 'Ponderosa' (i/i) x 'Viradoro' (I/I) inoculada com um isolado de Fol raça 1	
Nota 1 (50) = Resistente	<p style="text-align: center;"><u>Teste Qui-quadrado</u></p> <p style="text-align: center;">Frequência esperada/Frequência observada</p> <p style="text-align: center;">33,25 40</p> <p style="text-align: center;">99,75 93</p> <p style="text-align: center;">Valor de Qui-quadrado = 2,74</p>
Nota 2 (43) = Resistente	
Nota 3 (26) = Suscetível	
Nota 4 (8) = Suscetível	
Nota 5 (6) = Suscetível	
Total (n = 133)	Resistência monogênica dominante (3R:1S)
População 'Viradoro' (I/I) x 'LAM 205' (I-7/I-7) inoculada com um isolado de Fol raça 3	
Nota 1 (121) = Resistente	<p style="text-align: center;"><u>Teste Qui-quadrado</u></p> <p style="text-align: center;">Frequência esperada/Frequência observada</p> <p style="text-align: center;">50 47</p> <p style="text-align: center;">150 153</p> <p style="text-align: center;">Valor de Qui-quadrado = 0,24</p>
Nota 2 (32) = Resistente	
Nota 3 (18) = Suscetível	
Nota 4 (8) = Suscetível	
Nota 5 (21) = Suscetível	
Total (n = 200)	Resistência monogênica dominante (3R:1S)
População 'Ponderosa' (i/i) x 'LAM 205' (I-7/I-7) inoculada com um isolado de Fol raça 3	
Nota 1 (25) = Resistente	<p style="text-align: center;"><u>Teste Qui-quadrado</u></p> <p style="text-align: center;">Frequência esperada/Frequência observada</p> <p style="text-align: center;">70 66</p> <p style="text-align: center;">210 214</p> <p style="text-align: center;">Valor de Qui-quadrado = 0,29</p>
Nota 2 (189) = Resistente	
Nota 3 (13) = Suscetível	
Nota 4 (16) = Suscetível	
Nota 5 (37) = Suscetível	
Total (n = 280)	Resistência monogênica dominante (3R:1S)

*A avaliação foi feita 21 dias após a inoculação usando uma escala de notas variando de 1 a 5, adaptada de Santos (1999), sendo o 1 = plantas sem sintomas; 2 = plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; 3 = plantas com escurecimento vascular intenso e com início de murcha ou amarelecimento foliar; 4 = plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; 5 = plantas mortas.

Tabela 3 – *Primers* RAPD polimórficos entre os genótipos ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – Fol), ‘Viradoro’ (resistente a isolados de Fol raça 1 devido a presença do gene *I*) e LAM 205 (resistente a isolados de Fol raça 3 devido a presença do gene *I-7*).

Primers RAPD Operon®							
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPB-04	GGACTGGAGT	OPP-05	CCCCGGTAAC	OPW-05	GGCGGATAAG
OPA-04	AATCGGGCTG	OPB-05	TGCGCCCTTC	OPP-14	CCAGCCGAAC	OPW-06	AGGCCCGATG
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPB-06	TGCTCTGCCC	OPP-15	GGAAGCCAAC	OPW-07	CTGGACGTCA
OPA-07	GAAACGGGTG	OPK-14	CCCCTACAC	OPP-16	CCAAGCTGCC	OPW-14	CTGCTGAGCA
OPA-08	GTGACGTAGG	OPK-16	GAGCGTCGAA	OPP-17	TGACCCGCCT	OPW-15	ACACCGGAAC
OPA-09	GGGTAACGCC	OPK-17	CCCAGCTGTG	OPQ-13	GGAGTGGACA	OPW-16	CAGCCTACCA
OPA-11	CAATCGCCGT	OPM-16	GTAACCAGCC	OPQ-15	GGGTAACGTG	OPW-18	TTCAGGGCAC
OPA-15	TTCCGAACCC	OPM-17	TCAGTCCGGG	OPR-04	CCCGTAGCAC	OPW-19	CAAAGCGCTC
OPA-16	AGCCAGCGAA	OPM-18	CACCATCCGT	OPS-04	CACCCCCTTG	OPX-13	ACGGGAGCAA
OPA-18	AGGTGACCGT	OPN-01	CTCACGTTGG	OPS-11	AGTCGGGTGG	OPY-02	CATCGCCGCA
OPA-19	CAAACGTCGG	OPN-15	CAGCGACTGT	OPT-07	GGCAGGCTGT	OPY-19	TGAGGGTCCC
OPA-20	GTTGCGATCC	OPN-19	GTCCGTA CTG	OPT-11	TTCCCCGCGA	OPZ-03	CAGCACCGCA
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPN-20	GGTGCTCCGT	OPT-14	AATGCCGCAG	OPZ-05	TCCCATGCTG
OPB-02	TGATCCCTGG	OPO-06	CCACGGGAAG	OPW-02	ACCCCGCCAA	OPZ-13	GACTAAGCCC
OPB-03	CATCCCCTG	OPP-04	GTGTCTCAGG	OPW-04	CAGAAGCGGA	OPZ-16	TCCCCATCAC

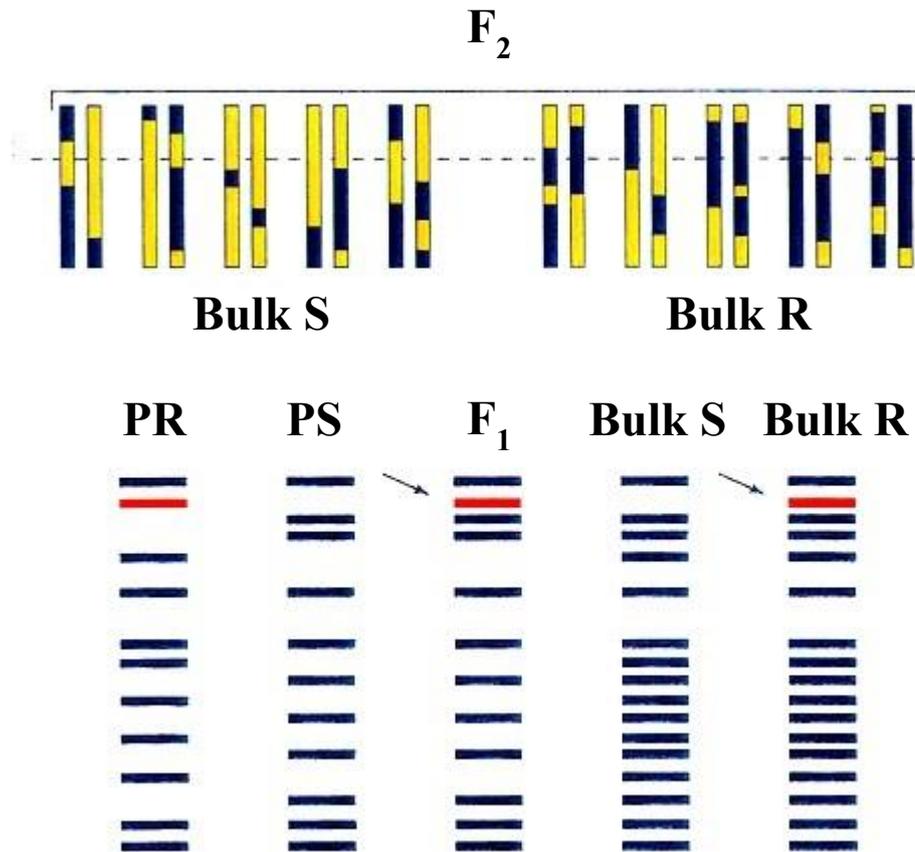


Figura 1 – A estratégia empregada para identificação de marcadores moleculares ligados aos fatores *I* e *I-7* foi a combinação do sistema de marcadores RAPD com o sistema de ‘*Bulked segregant analysis*’ (BSA) proposta por Michelmore *et al.* (1991). Nessa estratégia o DNA genômico é extraído dos genótipos parentais e uma mescla equimolar de DNA genômico extraído de um grupo seletivo de indivíduos F_2 resistentes (= *bulk R*) e de indivíduos F_2 suscetíveis (= *bulk S*). Esse trabalho foi conduzido via análise por mapeamento genético usando populações segregantes para os dois genes e distintos sistemas de marcadores moleculares (Esquema modificado de Michelmore *et al.*, 1991).

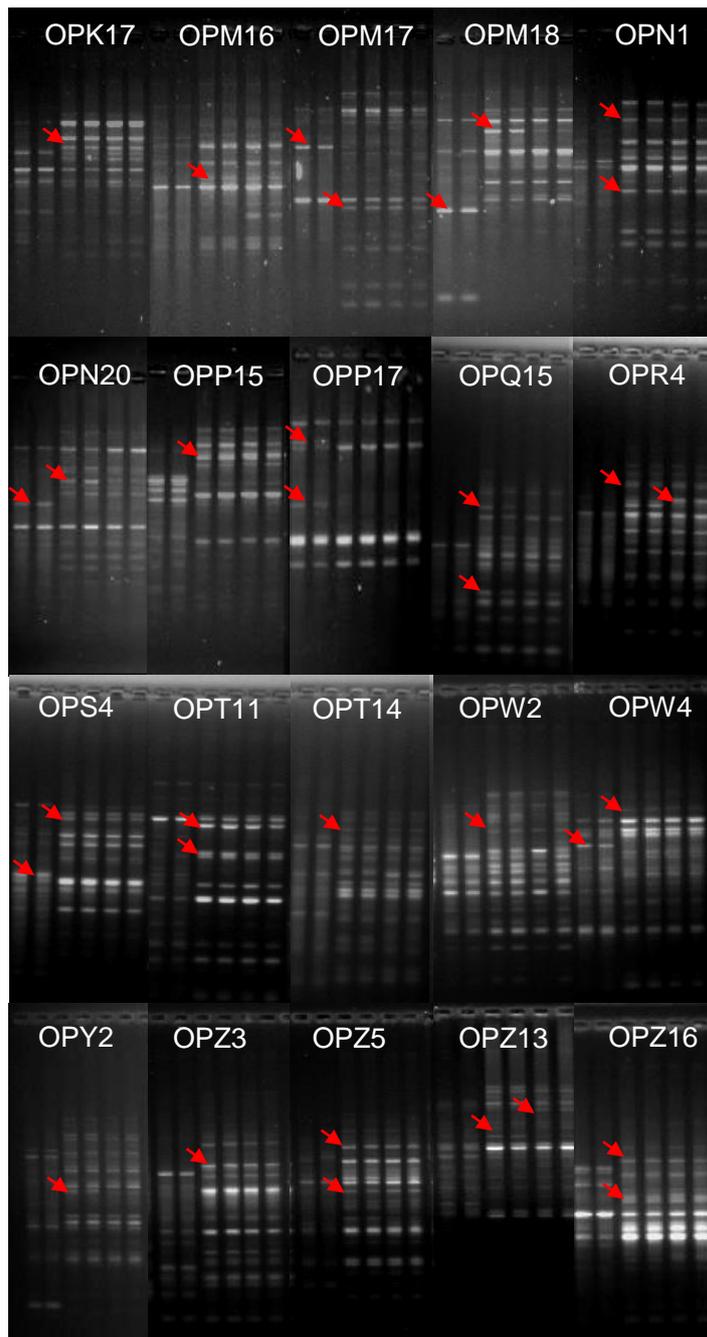


Figura 2 – Amostra de um painel de *primers* RAPD que identificaram polimorfismos (indicados por setas vermelhas) entre os três parentais contrastantes para resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* – Fol. As duas primeiras linhas de corrida (para cada *primer*) correspondem ao perfil de amplicons da variedade ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de Fol), as duas centrais correspondem ao perfil de amplicons da cultivar ‘Viradoro’ (resistente a isolados de Fol raça 1 devido a presença do gene *I*) e os duas últimas correspondem a linhagem ‘LAM 205’ (resistente a isolados de Fol raça 3 devido a presença do gene *I-7*).

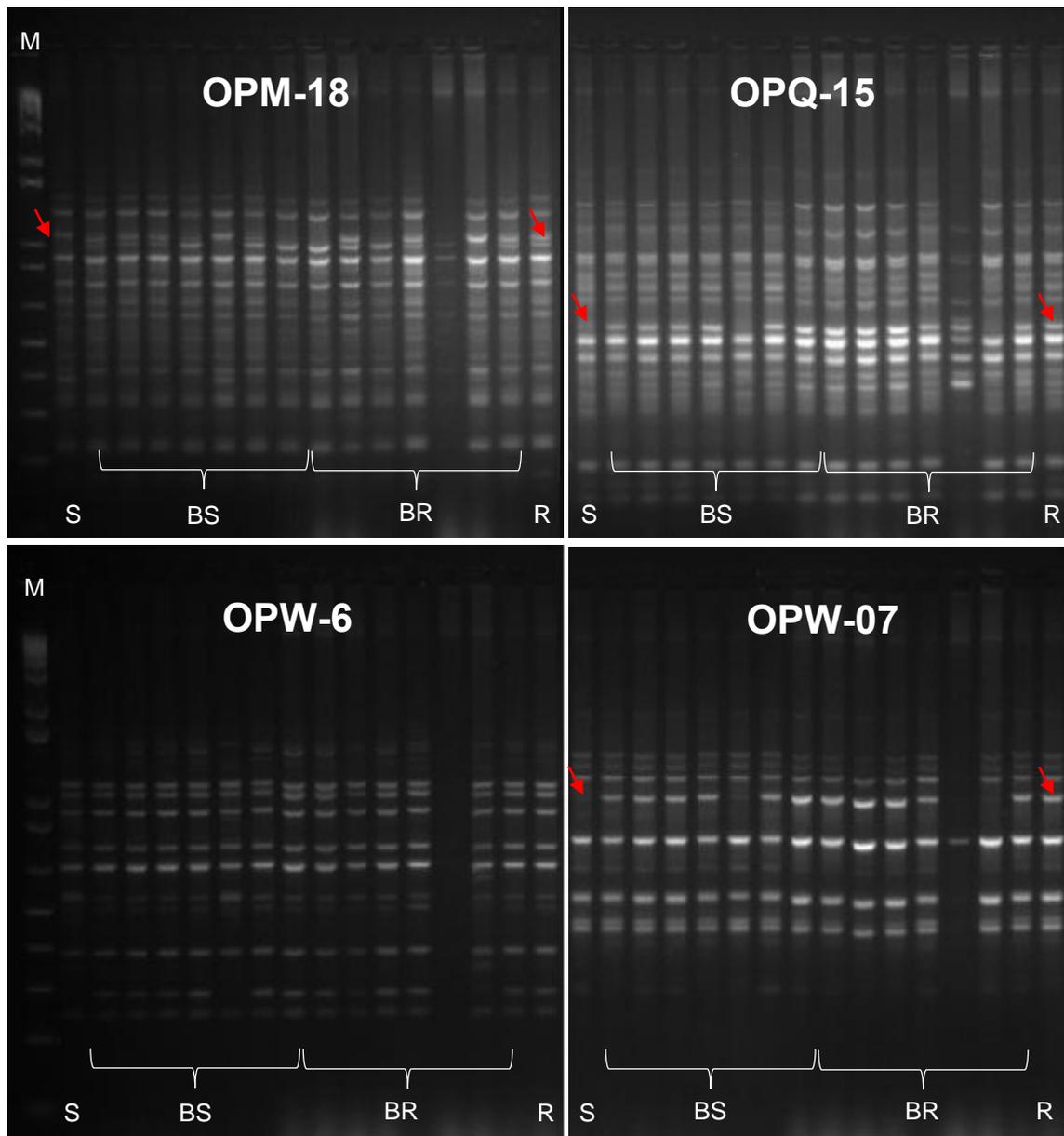


Figura 3 – Primers RAPD (OPM-18, OPQ-15, OPW6, OPW7) avaliados nas populações segregantes para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) raça 1. Primeira linha de corrida = padrão de amplicons para o parental suscetível (S) ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de Fol); seguido de conjunto de sete plantas F₂ suscetíveis componentes do *bulk* S (assinalados pela chave S); conjunto de sete plantas F₂ resistentes componentes do *bulk* R (assinalados pela chave R) e última coluna parental resistente (R).

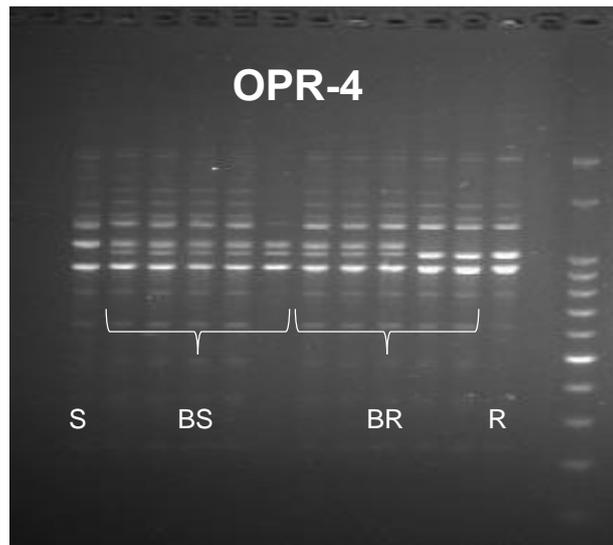


Figura 4 – Polimorfismo do tipo codominante encontrado entre conjunto de plantas F₂, suscetíveis (assinalados pela chave BS) e resistentes (assinalados pela chave BR) a murcha de fusário, e os genótipos ‘Ponderosa’ (S) e ‘Viradoro’ (R), utilizando o primer OPR-4.

CAPÍTULO 4

Busca por marcadores moleculares e genes candidatos associados com a região genômica do cromossomo 11 do tomateiro contendo o gene *I* de resistência a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1

Busca por marcadores moleculares e genes candidatos associados com a região genômica do cromossomo 11 do tomateiro contendo o gene *I* de resistência a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1

RESUMO - Em plantas, os genes de resistência (R) codificam proteínas que reconhecem a presença de componentes específicos dos patógenos. O tomateiro é uma hortaliça que pode ser afetada por diversos problemas bióticos e abióticos, que reduzem significativamente a produtividade e a qualidade do produto comercial. Três loci foram identificados e geneticamente caracterizados para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), agente causal de uma das mais importantes doenças da cultura, a murcha de fusário. Mesmo com toda a informação de sequências e inúmeros marcadores identificados até o momento, ainda não existem marcadores bem definidos para os genes de resistência a Fol. Embora tenha sido o primeiro fator de resistência identificado em tomateiro, o gene *I* (que confere resistência a raça 1 do patógeno) ainda não foi clonado e ainda não se sabe o posicionamento preciso desse gene no cromossomo 11. Dois *primers* descritos em ligação com o locus *I* (SSR67 e AT2) foram validados nos genótipos de tomateiro contrastantes ‘Ponderosa’ (suscetível) e ‘Viradoro’ (resistente à raça 1 de Fol) e em uma população segregante obtida do cruzamento entre esses parentais. Foi possível diferenciar os genótipos contrastantes, no entanto, não foi possível monitorar a incorporação da resistência na população segregante. Assim, foi construído um mapa físico utilizando os marcadores já descritos e marcadores do tipo Solcaps polimórficos entre genótipos de referência suscetíveis e resistentes a Fol raça 1 (‘MoneyMaker’, ‘Heinz 1706’ e *Solanum pimpinellifolium*). Esses marcadores foram utilizados para a genotipagem da população segregante e construção do mapa genético em torno da região alvo. Um gene com características semelhantes ao gen *I-2* (resistência a raça 2 de Fol) foi encontrado na região próxima aos marcadores SSR67 e AT2 e foi objeto de análises mais detalhadas. A comparação entre as sequências obtidas dos parentais e da população F₂ não mostrou nenhum polimorfismo (SNPs ou InDels), excluindo, momentaneamente, como candidato ao fator de resistência a Fol raça 1. Novas anotações de sequências NBS-LRR foram feitas no genoma e servirão de banco de dados para a busca de novos candidatos a fatores de resistência a Fol raça 1.

Palavras-chave: tomate, resistência a doenças, murcha de fusário, seleção assistida

Search for candidate genes and molecular markers associated with genomic region of chromosome 11 of tomato containing the *I* gene resistant to

***Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1**

ABSTRACT - In plants, resistance (R) genes encode proteins that recognize the presence of specific components of pathogens. The tomato is a vegetable crop that can be affected by a number of biotic and abiotic problems that significantly reduce yield and quality of the commercial product. Distinct genetic factors were identified and genetically characterized for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), the causal agent of the fusarium wilt, one of the most important worldwide diseases of this crop. Even with all the sequences of information and numerous markers identified to date, there are still no well-defined markers for some of the Fol resistance genes. Although it was the first identified resistant factor, the *I* gene (which controls Fol race 1 resistance) has not yet been cloned and its precise location in the chromosome 11 is uncertain. Here two described primers (SSR67 and AT2) linked to the locus *I* were validated in the contrasting lines ‘Ponderosa’ (susceptible), ‘Viradoro’ (resistance to Fol race 1 due to the presence of the gene *I*) and in a segregating population obtained from the cross between these two inbred lines. It was possible to discriminate the susceptible and the resistant lines, however, they not allowed a precise monitoring the resistant locus incorporation in the segregating population. A physical map was constructed using as these markers as initial anchors and enriched with Solcaps markers that were polymorphic among reference genotypes susceptible and resistant to Fol race 1 (‘MoneyMaker’, ‘Heinz 1706’, and *Solanum pimpinellifolium*). These markers were used for genotyping the segregating population and allowed for the construction of the genetic map around the target region. A gene with similar characteristics to the *I-2* gene (Fol race 2 resistance) was found in the marker region and was studied in more details. A comparison of the sequences obtained from the parental lines and from a sample of F₂ individuals showed no polymorphisms (SNPs or InDels), excluding this gene as a possible gene *I* candidate. More recent annotation allocated new NBS-LRR genes in the same target regions and they will serve as a database for searching for new candidates to Fol race 1 resistance factor.

Keywords: tomato, disease resistance, fusarium wilt, marker-assisted selection

INTRODUÇÃO

Os genes de resistência (R) em plantas codificam proteínas que reconhecem a presença de componentes específicos dos patógenos. Em patógenos, os genes que codificam esses componentes direta ou indiretamente, são chamados genes de avirulência. Esta correspondência de genes de resistência em plantas com genes de avirulência específicos do patógeno tem sido denominada de “modelo gene-a-gene” (Flor, 1956; Keen, 1990). Uma característica universal que tem sido constatada à medida que novos genes de resistência que se enquadram dentro do “modelo gene-a-gene” vêm sendo clonados é que a maioria deles apresenta domínios estruturais do tipo NBS (*Nucleotide binding sites*) e do tipo LRR (*Leucine-rich repeat*). A natureza conservada desses domínios tem sido explorada para buscar novas sequências semelhantes aos genes de resistência em diferentes acessos de uma mesma espécie e mesmo entre acessos de espécies próximas. Essa conservação filogenética dos motivos estruturais de genes de resistência também tem auxiliado na identificação de potenciais genes de resistência análogos contra certos grupos taxonômicos de patógenos (Aarts *et al.*, 1998; Hemming *et al.*, 2004).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas comercialmente em todos os continentes. Pode ser afetada por diversos fatores bióticos e abióticos, que reduzem significativamente a produtividade e a qualidade do produto comercial (Lopes *et al.*, 2005; Barone *et al.*, 2009). A murcha de fusário [causada por diferentes raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)] é uma das principais doenças que acometem esta cultura. O controle dessa doença é muito difícil, sendo a única medida segura, eficiente e economicamente viável o emprego de variedades e híbridos resistentes.

Diferentes fatores de resistência foram identificados e geneticamente caracterizados para resistência as distintas raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (ver **Tabela 1, capítulo 3**). O primeiro gene de resistência vertical contra este patógeno (denominado de gene *I = Immunity*) foi relatado por Bonh & Tucker (1939) no acesso de *S. pimpinellifolium* ‘PI 79532’. Esse fator foi posteriormente localizado no cromossomo 11 e foi confirmado que confere imunidade

exclusivamente contra isolados da raça 1 de Fol (Paddock, 1950), sendo sua resistência quebrada por isolados das raças 2 e 3 (Cirulli & Alexander, 1966). Este gene *I* não é alélico a um segundo gene de resistência (*I-1*) descrito em um acesso de *S. pennellii* (Sarfatti *et al.*, 1991), embora ambos confirmam resistência a raça 1 de Fol. Aqui discutiremos o locus *I* advindo de *S. pimpinellifolium* localizado no cromossomo 11 (ver **Tabela 1, Capítulo 3**). A resistência às raças 1 e 2 de Fol, embora localizada no mesmo cromossomo, é controlada por genes diferentes (Cirulli & Alexander, 1966; Bournival *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 2004). Até a condução do presente trabalho, o gene de resistência a isolados de Fol raça 2 (denominado como *I-2*) tinha sido o único fator resistência a Fol isolado e clonado (Simons *et al.*, 1998). Assim, análises da proteína de *I-2* com proteínas do genoma do tomateiro disponíveis no banco de dados do SOLgenomics podem ser empregadas para localizar outras regiões homólogas potencialmente associadas com distintos genes de resistência a variantes de Fol em tomateiro. Por sua vez, a resistência à raça 3 é conferida por dois genes (*I-3* e *I-7*), ambos derivados de *S. pennellii*, que também conferem redução na suscetibilidade do tomateiro às outras raças do patógeno (para revisão ver Boiteux *et al.*, 2012). Recentemente, um grupo australiano conseguiu clonar um gene candidato presente na região genômica associada com o gene *I-3* no cromossomo 7 do tomateiro (Catanzariti *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de mapas genéticos extremamente densos tem permitido a localização genômica/isolamento de genes e o uso de diversos marcadores moleculares em programas de seleção assistida por marcadores (SAM) (Barone *et al.*, 2009, Foolad & Panthee, 2012). Estratégias de SAM têm sido utilizadas com sucesso para vários caracteres de herança simples (monogênicos), tornando o processo de seleção mais rápido e eficiente. Vários marcadores moleculares em estreita ligação ou mesmo dentro de alguns desses genes (= marcadores funcionais) já estão disponíveis para seleção assistida. Regiões do genoma que possuem genes controlando a expressão de características complexas (poligênicas) são

denominadas de “*quantitative trait loci*” ou “QTLs” (Tanksley, 2004). Os QTLs associados com uma dada característica quantitativa podem estar localizados em diferentes cromossomos e apresentar diferentes contribuições na expressão do fenótipo em estudo. O tomateiro é uma das plantas que serviram de modelo para o isolamento dos primeiros QTLs envolvendo tamanho e massa de fruto (Tanksley, 2004). Vários QTLs associados com diferentes caracteres de efeito quantitativo já foram identificados e mapeados tais como: rendimento, qualidade de fruta, tolerância a estresses e resistência horizontal a diferentes doenças. No entanto, a sua manipulação comercial em programas de SAM ainda é limitada (Foolad & Panthee, 2012). Por enquanto, estas técnicas, salvo algumas poucas exceções, estão sendo usadas apenas em pesquisas básicas, tais como estudos de herança e monitoramento de introgressões a partir de espécies silvestres.

Recentemente foi finalizado o sequenciamento completo dos genomas de uma variedade de tomateiro cultivado (*S. lycopersicum* ‘Heinz 1706’) bem como um acesso selvagem de *S. pimpinellifolium* (The Tomato Genome Consortium, 2012). Esse trabalho foi conduzido por um consórcio de países que sequenciaram regiões do genoma de todos os doze cromossomos do tomateiro. Antes disso, diversos genes de resistência a doenças foram localizados nos diferentes cromossomos via mapeamento genético e físico (= posicional) de alta resolução (Barone *et al.*, 2009). Mais recentemente, o sequenciamento e re-sequenciamento completo de diversas cultivares de polinização aberta de *S. lycopersicum* e de outras espécies selvagens foram obtidos via sequenciamento de nova geração (Lin *et al.*, 2014) e disponibilizados para a comunidade científica (www.tomatogenome.net, Variant Browser). Além disso, as informações moleculares advindas desses projetos têm permitido a síntese de “*primers*” altamente específicos que estão sendo empregados para gerar uma nova classe de marcadores moleculares obtidos diretamente a partir de informações dos genomas de referência atualmente disponíveis. Estes “*primers*” têm funcionado como instrumentos importantes no estabelecimento de SAM, visando “piramidar”

diversos fatores de resistência e de qualidade industrial em um único material genético.

O aporte de informações de genômica e bioinformática têm aumentado a eficiência e oferecido uma maior segurança no processo de seleção de plantas superiores dentro dos programas de melhoramento e podem facilitar a caracterização de genes de interesse, incluindo aqueles que controlam resistência à murcha de fusário no tomateiro. O gene *I*, inicialmente identificado em um acesso selvagem de *S. pimpinellifolium*, foi o primeiro a ser introgridido em cultivares de tomate para o controle da murcha de fusário na década de 1940. Essa resistência, no entanto, foi rapidamente “quebrada” por isolados que não continham o fator de avirulência *AvrI* ou que sofreram mutação no gene codificador desta proteína (Cai *et al.*, 2003). Testes de alelismo demonstraram que a resistência à raça 1 e 2 identificada em *S. pennellii* não é alélica a *I* e *I-2* (Bournival *et al.*, 1990). De fato, alguns isolados da raça 1 de Fol são capazes de superar os genes de resistência *I-2* e *I-3*. Isso evidencia que *I-3* possui uma ação que interfere com isolados das raças 2 e 3, mas não confere resistência contra isolados da raça 1 de Fol (Scott *et al.*, 2004). Desta forma, é de extremo interesse para o melhoramento prosseguir com o processo de piramidização do gene *I* em variedades de tomateiro, visando obter materiais genéticos com maior espectro, estabilidade e durabilidade de resistência contra o complexo de raças de Fol.

Mesmo com toda a informação de sequências e inúmeros marcadores identificados até o momento, ainda não existem marcadores bem definidos para os genes de resistência a Fol. Embora tenha sido o primeiro gene identificado, o gene *I* ainda não foi clonado e ainda não se sabe o exato local ocupado por esse gene no cromossomo 11. Neste contexto, o escopo do presente trabalho foi buscar novos marcadores via dados disponíveis dos genomas de *S. lycopersicum* ‘Heinz 1706’ e *S. pimpinellifolium* (espécie de onde esse gene foi introgridido). Para tal, foi conduzida uma análise exploratória de genes candidatos presentes na região do genoma onde foram localizados marcadores moleculares descritos em ligação com o gene *I* de

resistência a isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1. Os marcadores moleculares identificados usando esta estratégia foram posteriormente validados em uma população segregante para o locus *I*, visando identificar possíveis genes candidatos associados com a expressão da resistência a isolados de Fol raça 1.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de uma população segregante para o locus *I* – Todos os experimentos foram desenvolvidos em telados e casas de vegetação, assim como nos laboratórios de Fitopatologia, Genômica e Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças. Foi realizado cruzamento entre a cultivar Ponderosa (suscetível a todas as raças, utilizada com parental feminino) e ‘Viradoro’ (resistente a raça 1, utilizado como parental masculino ou doador de pólen). As sementes F_2 (heterozigotas) foram obtidas a partir da autofecundação controlada de uma única planta F_1 .

Caracterização da reação a um isolado de Fol raça 1 de uma população F_2 (segregante) em condições de casa de vegetação – Sementes F_2 (resultantes da autofecundação F_1) foram semeadas em bandejas de 128 células contendo substrato esterilizado (Plantmax[®]) e mantidas em casa de vegetação sob temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) e duas irrigações diárias (uma pela manhã e outra pela tarde). Após 21 dias do plantio (DAP) as mudas foram removidas e as raízes lavadas para remover o substrato aderido às mesmas. A porção apical foi cortada (aproximadamente 2 cm) e as raízes mergulhadas em suspensão de esporos por 3 min. Em seguida, as mudas foram transplantadas para vasos de 1L contendo uma mistura de argila, esterco bovino, areia e palha de arroz carbonizada esterilizada. Foram adicionados 5 mL da suspensão de conídios no colo de cada plântula após o transplante. Para produção do inóculo, foi utilizado um isolado da raça 1 de Fol (Fus 027) cultivado em meio BD por 7 dias, sob 12 horas de luz e temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$). Após este período, a suspensão foi filtrada em gaze dupla e a concentração ajustada para 1×10^6 , com o auxílio de um hemacitômetro. A

avaliação foi feita 21 dias após a inoculação usando uma escala de notas variando de 1 a 5, adaptada de Santos (1999), sendo o 1 = plantas sem sintomas; 2 = plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; 3 = plantas com escurecimento vascular intenso e com início de murcha ou amarelecimento foliar; 4 = plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; 5 = plantas mortas. Com base nas notas recebidas às plantas foram classificadas em resistentes ($R < 3$) e suscetíveis ($S \geq 3$).

Validação dos marcadores moleculares SSR 67 e At2 ligados com a resistência a Fol raça

1 – A caracterização da população F₂ foi realizada por meio de PCR utilizando dois marcadores moleculares previamente relatados em estreita ligação com o locus *I* (marcadores denominados como SSR67 e At2) que têm sido utilizados na identificação de acessos resistentes a isolados de Fol raça 1 (Parmar & Subramanian, 2011; Arens *et al.*, 2010). Para o marcador SSR67 (5'-GCA-CGA-GAC-CAA-GCA-GAT-TA-3' Forward/ 5'-GGG-CCT-TTC-CTC-CAG-TAG-AC-3' Reverse) a reação de PCR foi composta de 7 µL de água, 1,25 µL de tampão 10X com MgCl₂ a 15 mM, 2 µL de DNA (100 ng), 1 µL do *primer* (0,5F + 0,5R), 1 µL de DNTP e 0,25µL de *Taq* DNA polimerase. O programa consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95° por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 54°C por 45 segundos, extensão por 45 segundos, finalmente extensão a 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado. Para o marcador At2 a reação foi composta de 8 µL de água, 1,25 µL de tampão 10X, 0,75 de MgCl₂ a 15 mM, 1 µL de DNA (10 ng), 1 µL dos *primers* (0,5F + 0,5R), 1,25 µL de DNTP e 0,20µL de *Taq* DNA polimerase. O programa consistiu de desnaturação inicial a 90°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação, anelamento dos *primers* a 54°C por 45 segundos, extensão por 45 segundos, finalmente extensão a 72°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado. Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose (2%) sob luz ultravioleta.

Sequenciamento e posicionamento físico do marcador SSR67 para delimitação da região contendo o gene *I* – Os amplicons correspondentes ao marcador SSR67 foram extraídos do gel de agarose e purificados. Para a purificação das bandas foi utilizado o *Kit Invitrogen PureLink® (Quick Gel Extraction Kit)*, seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento das bandas foi realizado em um sequenciador ABI PRISM 3100 do Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças (CNPQ), utilizando o Kit ABI Prism BigDye® version 3.1 (Applied Biosystems do Brasil) e os iniciadores de síntese do vetor M13 (M13 “reverse” e “forward”). Sequências consenso foram obtidas usando o programa SeqMan (DNASTar) e as sequências nucleotídicas foram analisadas usando EditSeq (DNASTar). A qualidade das sequências foi avaliada através do programa SeqMan (Lasergene, Madison, WI) e as sequências de baixa qualidade foram removidas. As sequências correspondentes aos fragmentos polimórficos foram obtidas a partir do consenso dos fragmentos sequenciados com os iniciadores senso e anti senso utilizando-se o programa SeqMan (Lasergene)® DNASTar. Foi feita uma busca via BLAST dentro da plataforma Solgenomics.

Elaboração de mapa físico da região cromossômica contendo locus *I* tendo como referências as sequências dos marcadores SSR67 e At2 – As atividades de mapeamento genético da população segregante para o fator de resistência *I* foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético e Biotecnologia do Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”- CSIC - UMA, em Málaga na Espanha. A partir da definição da região do cromossomo 11 contendo as sequências dos dois marcadores referências, foi feita uma seleção de potenciais novos marcadores via análise comparativa dos genomas dos acessos ‘MoneyMaker’ (suscetível), ‘Heinz ES58’ (resistente) e *S. pimpinellifolium* (resistente) bem como do genoma referência da variedade *S. lycopersicum* ‘Heinz 1706’, todos disponíveis na plataforma www.tomatogenome.net (**Figura 2**). Após a identificação de SNPs (*single*

nucleotide polymorphisms) e Indels (*insertions/deletions*), novos marcadores moleculares foram desenhados visando à saturação da região alvo com múltiplos marcadores. Foi empregada nesse trabalho a técnica de *High Resolution Melting* (HRM), utilizando PCR em tempo real com o software Bio-Rad CFX Manager. Um mapa físico foi elaborado, utilizando marcadores e genes localizados nessa região específica do cromossomo 11, onde se foram alocados os marcadores já disponíveis na plataforma do SOLgenomics (<http://solgenomics.net/>) e os gerados no presente trabalho. O mapa de ligação genética foi construído utilizando o software JoinMap[®] version 4.0. Os marcadores moleculares mais fortemente ligados ao fenótipo de resistência a Fol raça 1 e potencialmente contrastantes entre os parentais ‘Ponderosa’ e ‘Viradoro’ foram purificados do gel, clonados, sequenciados e re-localizados no genoma de referência do tomateiro ‘Heinz 1706’), disponível na plataforma SOLGenomics (<http://solgenomics.net/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de população segregante para o locus *I* – O cruzamento foi realizado entre as cultivares Ponderosa e Viradoro. A variedade de *S. lycopersicum* ‘Ponderosa’ é uma variedade livre de qualquer introdução/introgressão gênica de espécies selvagens, o que condiciona a sua susceptibilidade à maioria dos patógenos da cultura. De fato, ainda não há relato de nenhum fator de resistência a nenhuma doença conhecida nessa variedade. As seguintes características de ‘Ponderosa’ podem ser destacadas: fruto graúdo tipo caqui, com crescimento indeterminado, com fruto redondo ligeiramente plano de cor vermelho escuro, com boa consistência e conservação. Já ‘Viradoro’ é uma isolinha da cultivar ‘IPA-5’ para o gene *Sw-5* (que confere resistência a diferentes espécies de *Tospovirus*). Além disso, é uma cultivar destinada ao processamento industrial, também resistente à mancha-de-estenfílio (*Stemphylium solani* Weber), à murcha de fusário (*F. oxysporum* (Schlecht) f. sp. *lycopersici* (Fol) (Sacc.) raça 1) e

aos nematóides das galhas (*Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*). Como características principais podem ser destacados: hábito de crescimento determinado, excelente cobertura dos frutos, sendo estes firmes e de formato quadrado-oblongo, maturação uniforme, com coloração externa vermelho-escuro brilhante (Giordano *et al.*, 2000).

Caracterização da população F₂ (segregante) em casa de vegetação – Foi utilizada uma população de 133 plantas para a caracterização quanto a resistência a Fol raça 1. Das plantas avaliadas, 50 receberam nota 1, 43 nota 2; 26 nota 3; oito foram classificadas como nota 4 e seis plantas receberam nota 5. Sendo assim, a herança da resistência apresentou um ajuste adequado para o modelo monogênico dominante de acordo com o teste de Qui-quadrado (ver **capítulo 3**).

Validação dos marcadores SSR 67 e At2 associados à região genômica contendo o fator de resistência a isolados de Fol raça 1 -- O par de *primers* SSR67 (5'GCA-CGA-GAC-CAA-GCA-GAT-TA3' / 5'GGG-CCT-TTC-CTC-CAG-TAG-AC-3') foi utilizado para confirmar a sua co-segregação na população segregante obtida do cruzamento entre 'Ponderosa' x 'Viradoro'. Esse marcador foi desenvolvido para discriminar variedades suscetíveis e resistentes a isolados Fol raça 1. Variedades resistentes devido à presença do alelo *I* apresentam um amplicon de aproximadamente 900 bp e variedades suscetíveis não amplificam esse fragmento. Esse marcador foi indicado a ser utilizado para avaliação de variedades resistentes, assim como de linhagens de melhoramento em relação à murcha de fusário. Algumas variedades tolerantes apresentam dois amplicons de quase completa comigração, denominados como (900 + 900) (Parmar & Subramanian, 2009; 2011). No entanto, esse perfil não foi observado na população empregada no presente estudo. Desta forma, foi possível observar com clareza a ausência do alelo no genótipo 'Ponderosa' e a presença do amplicon de 900 bp em 'Viradoro'. No entanto, quando utilizado na população F₂ foram observadas a amplificação da

banda em indivíduos suscetíveis e a ausência de amplificação em indivíduos resistentes, indicando que o marcador não está tão fortemente ligado ao fator de resistência. Resultados semelhantes foram encontrados por Parmar & Subramanian (2013) quando utilizaram o marcador descrito para o gene de resistência *I-1* no cromossomo 7 (TG194), onde o marcador não conseguiu distinguir as variedades de tomate resistentes e suscetíveis a Fol raça 1.

Arens *et al.* (2010) desenharam um *primer* com base no marcador COS de *Arabidopsis thaliana* que mostrou uma deleção de 7 bp na cultivar suscetível ‘Marmande’ quando comparada a resistente ‘Marporum’. Este *primer* foi descrito como um marcador para o locus *I* de resistência a raça 1 de Fol, sendo observado somente nas variedades resistentes um amplicon de aproximadamente 130 bp. Para observar se essa deleção também estava presente no genótipo Ponderosa (suscetível), foi desenhado novo *primer*, chamado At2, englobando essa região genômica e amplificando um segmento de aproximadamente 170 bp. Foi observado um amplicon muito maior que o esperado, com mais de 800 bp, no entanto a diferença entre o genótipo suscetível e o resistente foi preservada (**Figura 1**).

Ao avaliar a população F₂ com o marcador At2 não foi possível separar as plantas resistentes das suscetíveis, assim como não foi possível observar diferença entre plantas resistentes homozigotas e heterozigotas. A deleção existente entre um genótipo e outro é muito pequena e necessita de uma ferramenta adicional para ser observada. Mesmo assim, os resultados mostram que há polimorfismo entre os parentais para esta região genômica. O sequenciamento da região amplificada está sendo realizado, para identificar esta diferença, bem como para servir de base para o desenho de novos *primers* que consigam distinguir este locus na progênie segregante, tornando-o possível localizá-lo no mapa físico da região. Para ser útil, um marcador molecular deve ser capaz de diferenciar os progenitores e deve ser reproduzido com precisão na progênie segregante. Esse marcador pode estar inserido dentro do gene que condiciona o caráter (= marcador funcional) ou ter uma estreita ligação com o caráter desejado

(Vieira *et al.*, 2006). Desta forma, os marcadores existentes embora consigam diferenciar acessos suscetíveis e resistentes de tomateiro, não são boas ferramentas para o monitoramento da incorporação da resistência devido a frouxa ligação gênica, sensibilidade a falhas operacionais, e pela necessidade de ferramentas adicionais, como sequenciamento, para diferenciação precisa dos materiais contrastantes. Os dois marcadores estão localizados na mesma região e muito próximos no cromossomo 11, essa localização foi utilizada como uma âncora inicial para a elaboração do mapa físico em torno do locus *I*.

Elaboração de mapa físico e avaliação genotípica com marcadores ligados a região cromossômica para o locus *I* – Para a construção do mapa e genotipagem da população segregante foram conduzidas análises comparativas dos genomas de tomateiro contrastantes para o locus *I*. Estas informações estão disponíveis em vários bancos de dados como SolGenomics, GenBank e TGRC. Mais recentemente um novo banco de dados foi disponibilizado, o Tomatogenome.net que é uma plataforma que contém o genoma de 150 genótipos da espécie cultivada de tomateiro (*S. lycopersicum*) bem como de espécies selvagens, com objetivo de explorar a variação genética entre eles (**Figura 2**). Até a condução do presente trabalho, o gene *I-2* tinha sido único fator resistência a Fol que isolado e clonado (Simons *et al.*, 1998). Assim, análises da proteína de *I-2* com proteínas do genoma do tomateiro disponíveis no banco de dados do SOLgenomics, foram realizadas para localizar regiões homólogas a genes de resistência. O BLAST localizou vários genes do tipo NBS-LRR no cromossomo 11. A maioria dos genes de plantas conhecidos contém domínios NBS (*Nucleotide binding sites*) e LRR (*Leucine-rich repeat*). A natureza conservada desses domínios tem sido explorada para identificar sequências semelhantes aos genes de resistência ou genes de resistência análogos (Aarts *et al.*, 1998; Hemming *et al.*, 2004).

Distâncias genéticas não representam diretamente distâncias físicas, as frequências de recombinação variam entre as diferentes regiões do cromossomo e são influenciadas pela

diversidade nas sequências entre as linhagens parentais (Peters *et al.*, 2003). Assim, mapas físicos (**Figura 3**) consistem em genes ou marcadores localizados em posições físicas específicas com base em informações de sequências (Lim *et al.*, 2006). A partir disso, a região contendo os marcadores já descritos na literatura para o locus *I*, foi definida como candidata a localização do gene de resistência no cromossomo 11. Nessa análise inicial, apenas um gene (denominado como Solyc 010160.1.1) com características estruturais semelhantes ao gene *I-2* foi anotado nessa região do genoma. O gene Solyc 010160.1.1 foi considerado um forte candidato a ser o gene *I*, pois além de estar fisicamente na região de interesse, ele apresenta motivos CC-NBS-LRR que são típicos e conservados em outros genes de resistência. Esse gene candidato foi localizado na posição 3.254.831..3.257.557 do cromossomo 11 do genoma do tomateiro e foi objeto de análises mais detalhadas.

Foram desenhados 18 pares de *primers*, cobrindo uma região do cromossomo 11 mais estreitamente ligada ao fenótipo condicionado pelo gene *I*. Os *primers* foram desenhados tendo como base os marcadores Solcaps disponíveis e que se mostraram contrastantes entre genótipos de tomateiro suscetíveis e resistentes a Fol e a espécie selvagem *S. pimpinellifolium*. As informações disponíveis de genótipos resistentes e suscetíveis foram obtidas em uma plataforma de genotipagem em larga escala de marcadores SNPs usando uma ampla coleção de acessos de tomateiro do IHSM “La Mayora”. Buscou-se cobrir a maior parte do cromossomo para avaliar onde se encontrava o possível evento de introgressão contendo o gene *I*. Além disso, essa análise permitiria identificar qual parte do cromossomo está mais conservada e qual é a mais contrastante. A segregação desses marcadores foi monitorada entre os parentais com indivíduos fenotipados da população F₂. Dentre os *primers* testados dez se mostraram polimórficos entre os parentais ‘Ponderosa’ e ‘Viradoro’. Estes foram utilizados para genotipagem da população F₂. A genotipagem do SNPs foi realizada utilizando a técnica de *High Resolution Melting* (HRM). HRM é um método fácil de usar, simples, flexível, de baixo

custo, de natureza não destrutiva, sensibilidade soberba e especificidade, e que ainda permite realizar análises subsequentes, como por exemplo eletroforese em gel ou sequenciamento. A técnica foi desenvolvida para a detecção de sequências de DNA variantes e é bastante utilizada para genotipagem (Vossen *et al.*, 2009). Assim é possível caracterizar toda a população segregante, comparando-a com os parentais e a F₁. Por meio de comparação entre as curvas de *Melting*, obtidas com o PCR em tempo real, é possível classificar as plantas em homozigotas para R, heterozigotas e homozigotas para S (**Figura 4**).

Estes dados estão sendo avaliados para a construção de um mapa genético do cromossomo 11, utilizando a genotipagem da população F₂. No momento o número de marcadores identificados foi pequeno para permitir o desenvolvimento de um mapa genético de alta resolução. Desta forma, novos marcadores polimórficos serão avaliados e utilizados para genotipagem da população F₂, assim um mapa genético com maior densidade poderá ser construído para a região alvo. O desenvolvimento de mapas genéticos extremamente densos (com um número elevado de marcadores) tem permitido a localização genômica bem como o isolamento de genes no tomateiro. Diversos marcadores moleculares têm sido empregados em programas de seleção assistida de genótipos superiores. Vários genes de resistência a doenças já foram isolados e caracterizados em diferentes acessos de tomateiro via mapeamento genético/físico de alta resolução (Boiteux *et al.*, 2012).

Caracterização via análise de sequência do gene candidato nos genótipos parentais contrastantes – O gene candidato Solyc11g010160.1.1 está localizado no pequeno braço do cromossomo 11 bem próximo dos marcadores descritos na literatura para o locus *I*. Foram desenhados 12 pares de *primers* cobrindo toda a região alvo do gene candidato bem como a região promotora e um segmento da região 3' (**Figura 5**) para buscar polimorfismo entre os parentais contrastantes ‘Ponderosa’ e ‘Viradoro’. Foi realizado PCR utilizando todos os *primers*

desenhados. Os produtos de PCR obtidos dos parentais e de uma amostra da população F₂ foram purificados e sequenciados. Foi feito o *contig* para cada material sequenciado (ver estratégia de “primer-walking” **ilustrada na Figura 6**). A comparação entre as sequências dos genótipos parentais ‘Ponderosa’ e ‘Viradoro’ não mostrou nenhuma diferença (SNPs ou InDels) entre os mesmos. Um segmento dos eletroferogramas obtidos do sequenciamento dos dois parentais podem ser visualizados na **Figura 7**. A ausência de polimorfismos entre os parentais contrastantes exclui, momentaneamente, o gene Solyc11g010160.1.1 como candidato a ser o fator de resistência a Fol raça 1. Esse resultado impõe a necessidade de buscar novos genes candidatos na região.

A anotação do genoma do tomateiro vem se aperfeiçoando à medida que novas ferramentas de bioinformática são desenvolvidas e também via enriquecimento da informação gênica com bibliotecas genômicas e de cDNA RenSeq (ver Andolfo *et al.*, 2014). Recentemente foram identificadas 105 novas sequências NBS-LRR utilizando DNA genômico da cultivar ‘Heinz 1706’, sendo que 20 destas novas sequências estão distribuídas ao longo do cromossomo 11 (Andolfo *et al.*, 2014), que é a região alvo do presente trabalho. Infelizmente, esses genes não estavam disponíveis nos bancos de dados do genoma do tomateiro durante o processo de seleção de potenciais genes durante as etapas de realização do presente trabalho. Desta forma, novas buscas de polimorfismos usando a informação derivada destes genes de resistência serão conduzidas para definir novos candidatos a potenciais fatores de resistência ao Fol raça 1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os marcadores associados à resistência a raça 1 existentes, embora consigam diferenciar acessos suscetíveis e resistentes de tomateiro, não são boas ferramentas para o monitoramento da incorporação da resistência devido a ausência de ligação gênica forte, sensibilidade a falhas operacionais, e pela necessidade de ferramentas adicionais, como sequenciamento, para diferenciação precisa dos materiais contrastantes;
- No momento, o número de marcadores identificados foi pequeno para permitir o desenvolvimento de um mapa genético de alta resolução. Desta forma, novos marcadores polimórficos serão avaliados e utilizados para genotipagem da população F₂, assim um mapa genético com maior densidade poderá ser construído para a região alvo;
- Novas buscas de polimorfismos usando a informação derivada das novas anotações no genoma serão conduzidas para definir novos candidatos a potenciais fatores de resistência ao Fol raça 1.

LITERATURA CITADA

ANDOLFO G; JUPE F; WITEK K; ETHERINGTON GJ; ERCOLANO MR; JONES JDG (2014) Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. **BMC Plant Biology** 14: 120.

ARENS P; MANSILLA C; DEINUM D; CAVELLINI L; MORETTI A; ROLLAND S; van der SCHOOT H; CALVACHE D; PONZ F; COLLONNIER C; MATHIS R; SMILDE D; CARANTA C; VOSMAN B (2010) Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness; uniformity and stability testing. **Theoretical and Applied Genetics** 120: 655–664.

BOHN GW; TUCKER CM (1939) Immunity to *Fusarium* wilt in the tomato. **Science** 89:603–604.

BOURNIVAL BL; VALLEJOS CE; SCOTT JW (1988) Two new enzyme loci for chromosome 1. **Report of the Tomato Genetics Cooperative** 38:10–11

BOURNIVAL BL; SCOTT JW; VALLEJOS CE (1989) An isozyme marker for resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **Theoretical and Applied Genetics** 78:489–494.

CAI G; GALE LR; SCHNEIDER RW; KISTLER HC; DAVIS RM; ELIAS KS; MIYAO EM (2003) Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. **Phytopathology** 93: 1014–1022.

CATANZARITI; AM; LIM; GTT; JONES; DA (2015) The tomato *I-3* gene: A novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. **New Phytologist** (on line).

CIRULLI M; ALEXANDER LJ (1966) A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology**: 56: 1301-1304.

FLOR HH (1956) The complementary genic systems in flax and flax rusts. **Advances in Genetics** 8: 29–54.

FOOLAD; MR.; PANTHEE; DR (2012) Marker-assisted selection in tomato breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences** 31: 93–123;

GIORDANO LB; DE ÁVILA AC; CHARCHAR JM; BOITEUX LS; FERRAZ E (2000) ‘Viradoro’: A Tosspovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. **HortScience** 35: 1368–1379.

HEMMING MN; BASUKI S; McGRATH DJ; CARROLL BJ; JONES DA (2004) Fine mapping of the tomato *I-3* gene for *Fusarium* wilt resistance and elimination of co-segregating resistance gene analogue as a candidate for *I-3*. **Theoretical and Applied Genetics** 109: 409–418.

LIM GTT; WANG G-P; HEMMING MN; BASUKI S; McGRATH DJ; CARROLL BJ; JONES DA (2006)

Mapping the *I-3* gene for resistance to *Fusarium* wilt in tomato: Application of an *I-3* marker in tomato improvement and progress towards the cloning of *I-3*. **Australasian Plant Pathology** 35: 671–680.

LIN T; ZHU G; ZHANG J; XU X; ZHENG Z; ZHANG Z; LUN Y; LI S; WANG X; HUANG Z; LI J; ZHANG C; WANG T; ZHANG Y; WANG A; ZHANG Y; LIN K; LI C; XIONG G; XUE Y; MAZZUCATO A; CAUSSE M; FEI Z; GIOVANNONI JJ; CHETELAT RT; ZAMIR D; STADLER T; LI J; YE Z; DU Y; HUANG S (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature Genetics** 46: 1220–1228.

LOPES CA; REIS A; BOITEUX LS (2005) Doenças Fúngicas. In: LOPES CA; ÁVILA AC. (orgs). Doenças do Tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças. 151pp.

PADDOCK EF (1950) A tentative assignment of the *Fusarium*-immunity locus to linkage group 5 in tomato. **Genetics** 35: 683–684.

PARMAR P; SUBRAMANIAN RB (2011) PCR based method for testing *Fusarium* wilt resistance of tomato. **African Journal of Basic and Applied Sciences** 3: 219–222.

PAMAR P; SUDHIR A; PREETHI R; DAVE B; PANCHAL K; SUBRAMANIAN RB; PATEL A; KATHIRIA KB (2013) Identification of a SSR marker (TOM-144) linked to *Fusarium* wilt resistance in *Solanum lycopersicum*. **American Journal of Molecular Biology** 3: 241–247.

PAMAR P; SUBRAMANIAN RB (2013) Isolation of NBS-LRR class resistant gene (*I2* gene) from tomato cultivar Heamsona. **African Journal of Biotechnology** 12: 6076–6078.

PETERS JL; CNUUDE F; GERATS T (2003) Forward genetics and mapbased cloning approaches. **Trends in Plant Science** 8: 484–491.

REIS A; GIORDANO LB; BOITEUX LS; LOPES CA (2004) Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 4: 495–502.

SANTOS JRM (1999) Protocolo de Tecnologia: Tomateiro/ Murcha de fusário (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Comunicado Técnico nº11. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças. 4pp.

SCOTT JW; AGRAMA HA; JONES JP (2004) RFLP-based analysis of recombination among resistance genes to *Fusarium* wilt races 1, 2 and 3 in tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 129: 394–400.

SIMONS G; GROENENDIJK J; WIJBRANDI J; REIJANS M; GROENEN J; DIERGAARDE P; VAN DER LEE T; BLEEKER M; ONSTENK J; DE BOTH M; HARING M; MÊS J; CORNELISSEN B; ZABEAU M; VOS

P (1998) Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and once active gene copy. **The Plant Cell** 10: 1055–1068.

TANKSLEY SD (2004) The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. **The Plant Cell** 16 (Supplement): S181–S189,

TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature** 485: 635–641.

VAN OOIJEN JW (2006) JoinMap® 4: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.

VOSSSEN RHAM; ATEN E; ROOS A; den DUNNEN JT (2009) Review: High-resolution Melting Analysis (HRMA) – More than just sequence variant screening. **Human Mutation** 30: 860–866.

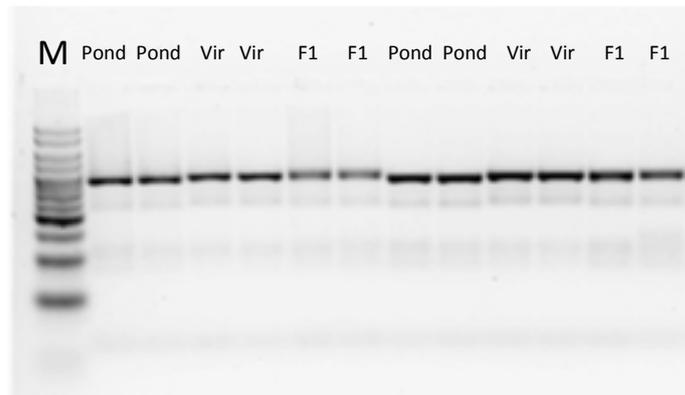


Figura 1 – Produtos de PCR utilizando o *primer* At2 observados em gel de agarose. Diferenças entre os genótipos: **Pond** = ‘Ponderosa’; **Vir** = ‘Viradoro’; **F1**= híbrido ‘Ponderosa’ x ‘Viradoro’. **M** = Marcador molecular. Embora seja discreta é possível observar a diferença na mobilidade do amplicon entre os genótipos ‘Ponderosa’ e os demais.

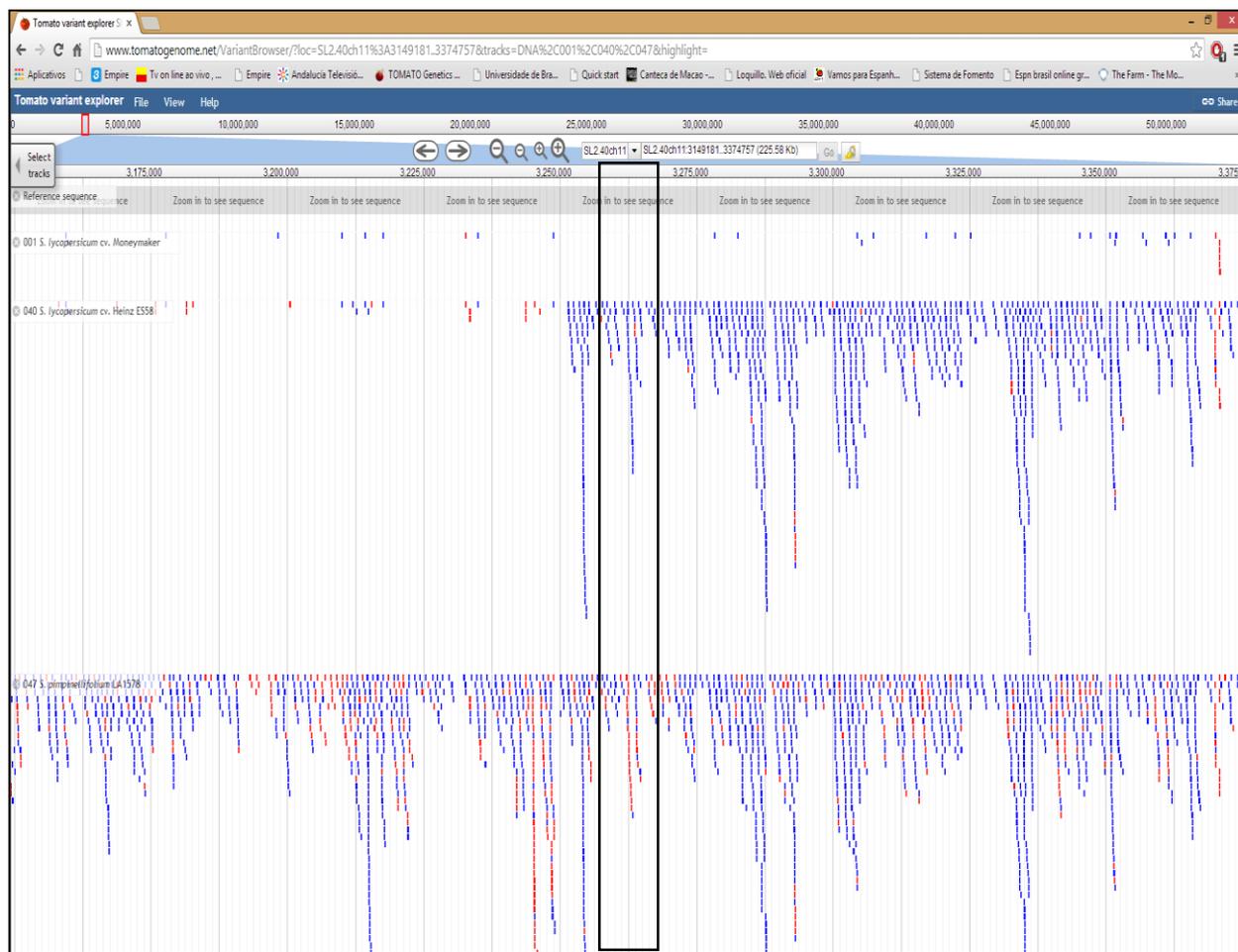


Figura 2 – Página da plataforma Tomatogenome.net, mostrando a comparação entre o genoma dos genótipos MoneyMaker (suscetível), Heinz (resistente) e *S. pimpinellifolium* (resistente). Os pontos em vermelho e azul representam polimorfismos quando comparados com o genoma de referência. Observar que nesta região existem vários polimorfismos em ‘Heinz’ e *S. pimpinellifolium*, mas nenhum polimorfismo na cultivar ‘Moneymaker’.

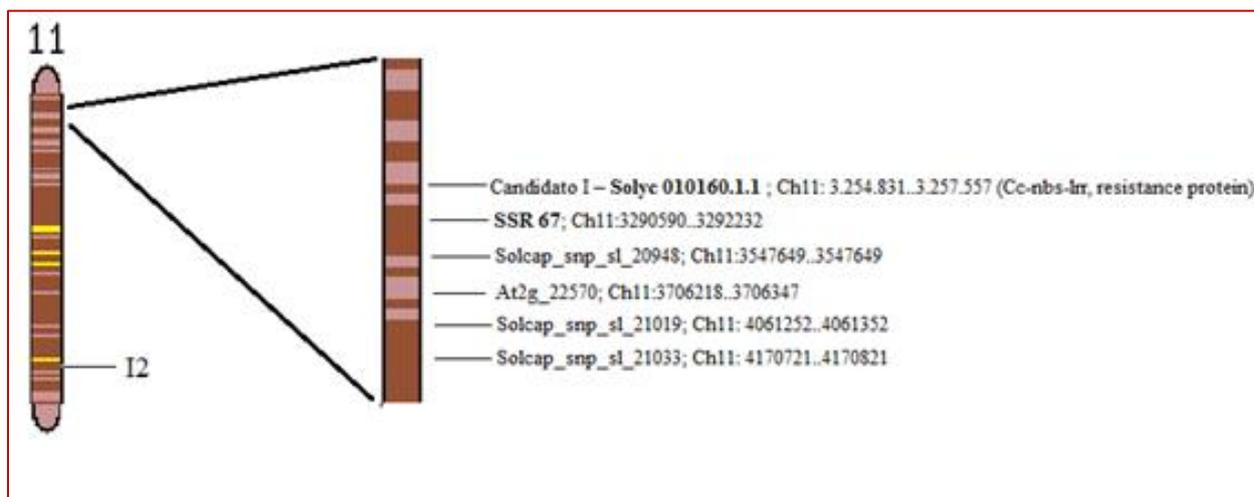


Figura 3 – Mapa físico da região do cromossomo 11 que contém os marcadores ligados a resistência a raça 1 de Fol e marcadores Solcaps polimórficos entre os genótipos Ponderosa (suscetível a todas as raças de Fol) e ‘Virador’ (resistente a raça 1 de Fol devido a presença do gene *I*). A posição de cada marcador no cromossomo está descrita de acordo com as anotações do genoma de referência do tomateiro no SolGenomics.

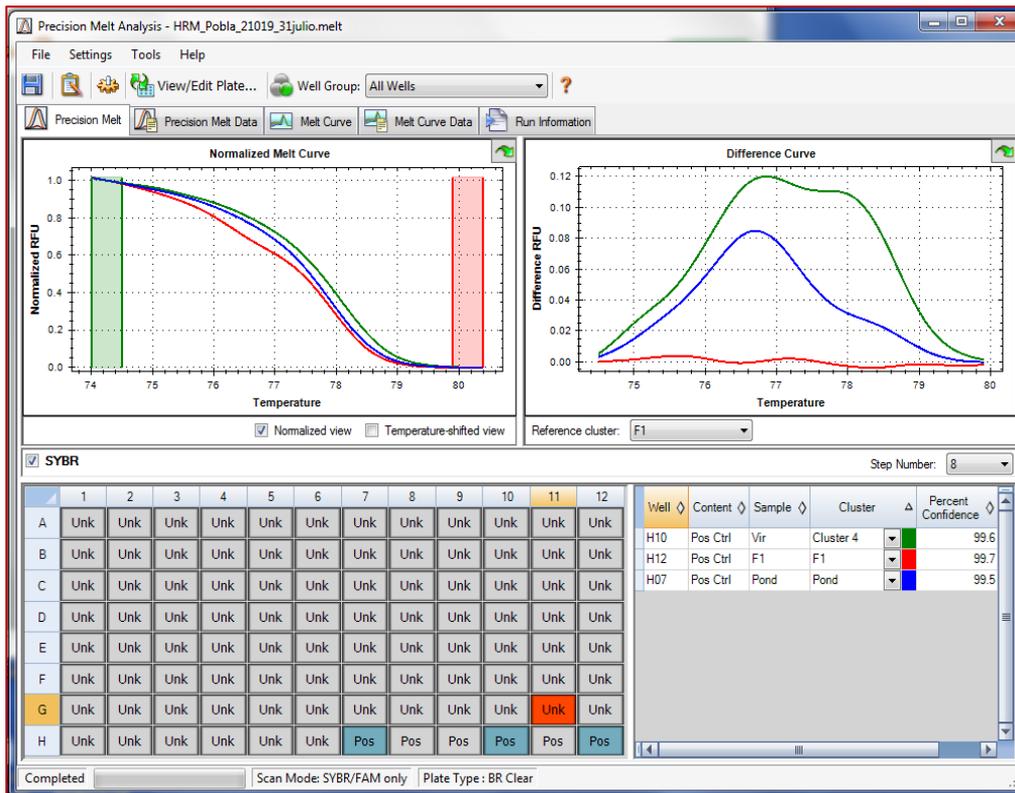


Figura 4 – Curvas de Melting obtidas durante o PCR em tempo real. As curvas servem de referência para a genotipagem da população F_2 , que é feita por comparação. As cores diferentes das curvas representam os parentais e a F_1 .

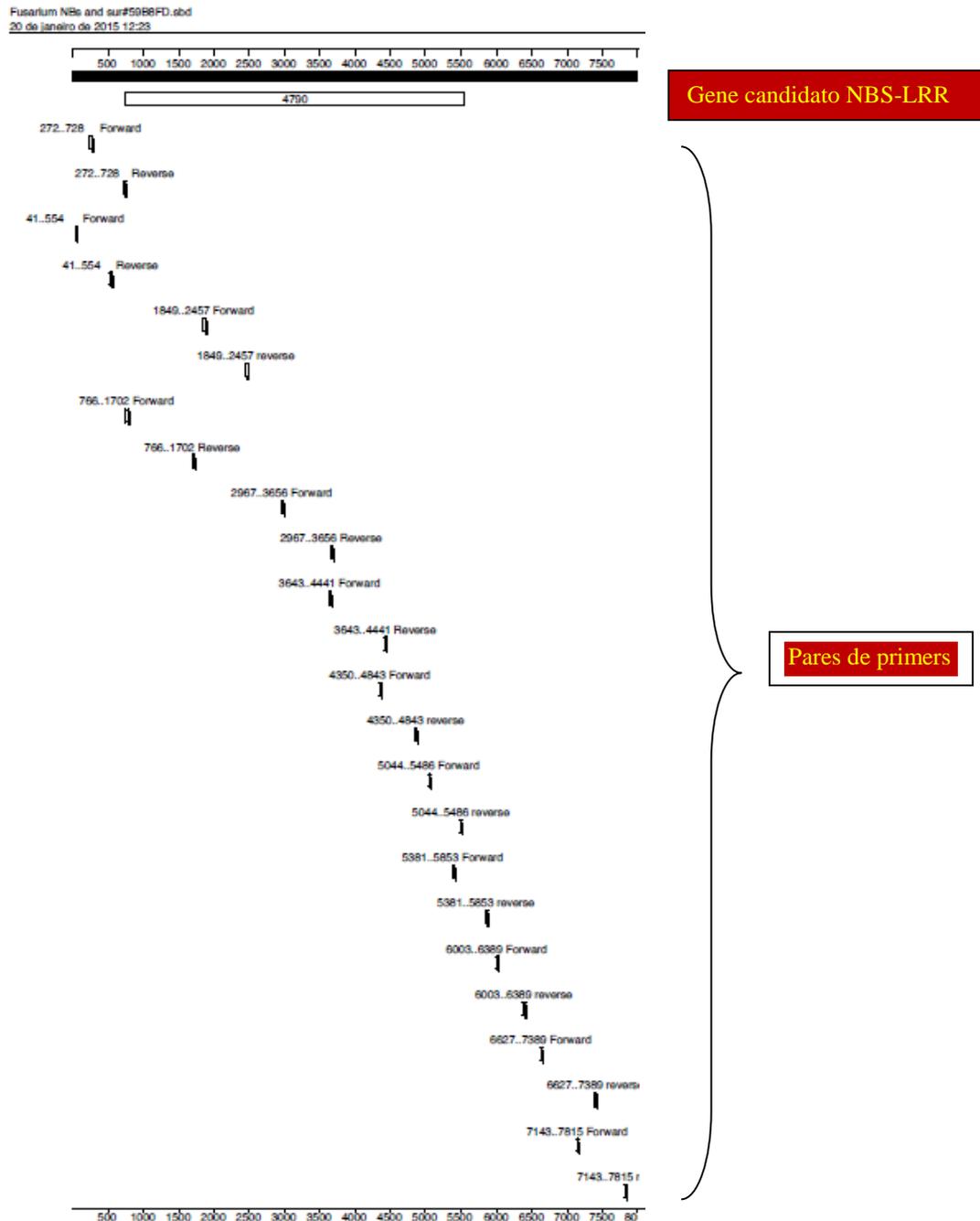


Figura 5 – Estratégia de *primer-walking* para cobrir toda a região do gene candidato NBS-LRR (Solyc 010160.1.1.). A localização dos *primers* desenhados para o gene candidato. Observar que os primers cobrem uma região de aproximadamente 700 bases na posição 5' e mais 2000 bases na posição 3'.

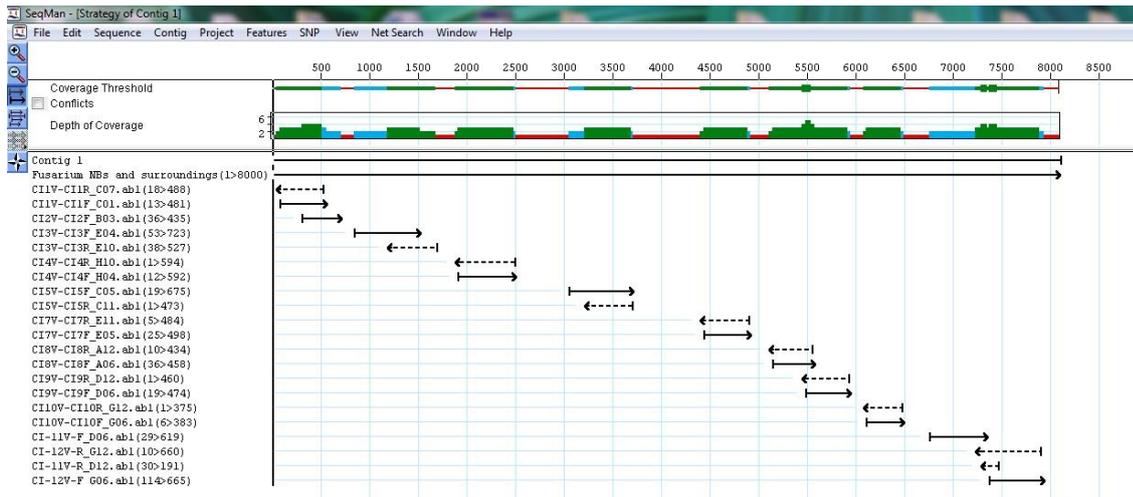


Figura 6 – Estratégia de *primer-walking* para cobrir toda a região do gene candidato NBS-LRR (Solyc 010160.1.1.). A localização dos *primers* desenhados para o gene candidato. Observar que os primers cobrem uma região de aproximadamente 700 bases na posição 5' e mais 2000 bases na posição 3'.

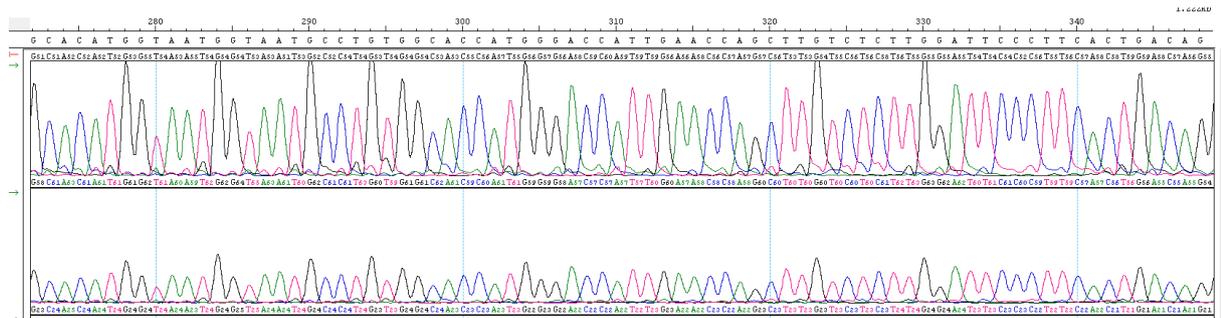


Figura 6 – Ilustração de um segmento do eletroferograma (entre os nucleotídeos 270 e 350) dos *contigs* das linhagens contrastantes ‘Viradoro’ (resistente a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* – Fol raça 1 devido a presença do gene *I*; parte superior da figura) ‘Ponderosa’ (suscetível a todas as raças de Fol, parte inferior da figura) para um gene candidato do tipo NBS-LRR (Solyc 010160.1.1.), localizado no topo do cromossomo 11 do tomateiro e ligado ao fenótipo de resistência. Observar que os acessos são idênticos, encontrado ao longo de toda a sequencia (aproximadamente 7500 bases), indicando a ausência de polimorfismos (InDels ou SNPs) neste gene bem como nas regiões adjacentes.

CONCLUSÕES GERAIS

- Uma coleção brasileira representativa de 118 isolados foi caracterizada por meio da reação em acessos de *Solanum* (sect. *Lycopersicon*), permitindo catalogar a presença de dez isolados da raça 1; 27 isolados da raça 2 e 77 isolados da raça 3.
- Todos os isolados coletados a partir do ano de 2003 foram identificados como raça 3 por testes de virulência. O presente levantamento indicou que a raça 3 está presente no ES, RJ, BA e confirmou a presença desta raça no Estado de Minas Gerais, expandindo a abrangência geográfica dessa variante patogênica.
- O conjunto de *primers* específicos Uni, Sp13, Sp23 e Spr1 desenvolvidos por Hirano & Arie (2006) não se mostrou eficiente em diferenciar as raças brasileiras 1 e 2, que apresentaram padrão de amplicons idênticos para todos os isolados e correspondentes aos descritos para a raça 1.
- Em relação aos isolados brasileiros da raça 3, o sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006) apresentou uma completa correspondência entre os testes de virulência e o padrão molecular.
- Um resultado inicialmente não esperado foi a detecção de um padrão molecular específico de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) em quatro isolados da coleção.
- Forl é um patógeno ainda não descrito no território brasileiro. A comprovação do primeiro relato desse patógeno está dependente apenas dos testes patogenicidade ora em andamento.
- O conjunto de *primers* derivado da série gênica *SIX* (*secreted in xylem*) correspondentes aos genes *SIX1* até *SIX7* não se mostraram eficientes em discriminar as raças de Fol, sendo úteis apenas para discriminar isolados de Fol e Forl.

- A análise conduzida com 520 *primers* RAPD revelou um baixo nível de polimorfismos entre os isolados brasileiros das raças 1 e 2, reforçando a noção de que estas duas variantes do patógeno possuem uma estreita proximidade genética e possível origem comum.
- O resultado do alinhamento de sequência de uma região polimórfica entre bulks de raças (denominada SCAR OP-Z4 ou R2BR) apresentou elevados níveis de identidade com uma região MFS (= “Major Facilitator Superfamily”) do genoma Fol. Essa família gênica codifica proteínas que facilitam o transporte de múltiplos compostos através de membranas e pode ser um gene candidato para definição do perfil de virulência e/ou patogenicidade de Fol.
- A caracterização dessa coleção de isolados brasileiros de Fol demonstra a variabilidade global desse patógeno e fornece indicações de que diferentes processos/mecanismos de evolução estão atuando no sentido de selecionar novas raças e variantes deste patógeno nos diferentes agroecossistemas de cultivo do tomateiro nas diferentes regiões geográficas no Brasil e no mundo.
- Os marcadores moleculares associados a resistência à raça 1 disponíveis na literatura não se mostraram boas ferramentas para o monitoramento da incorporação da resistência devido a fraca ligação gênica, sensibilidade a falhas operacionais, e pela necessidade de estratégias adicionais, tais como sequenciamento, para diferenciação mais precisa dos materiais contrastantes.
- O sistema RAPD em combinação com *bulked segregant analysis* não foi eficiente em identificar marcadores ligados aos fatores *I* e *I-7*. Novos sistemas de marcadores devem ser utilizados aproveitando a fenotipagem feita em três populações segregantes.
- Um gene candidato (Solyc11g010160.1.1) foi localizado no pequeno braço do cromossomo 11 em estreita associação física com marcadores descritos na literatura

para o locus *I*.

- Foram desenhados 12 pares de *primers* cobrindo toda a região alvo do gene candidato bem como a região promotora e um segmento da região 3'. Os produtos de PCR obtidos dos parentais e de uma amostra da população F₂ foram purificados e sequenciados. Foi feito o *contig* para cada material sequenciado.
- No entanto, a comparação entre as sequências dos genótipos parentais 'Ponderosa' e 'Viradoro' não mostrou nenhuma diferença (SNPs ou InDels) entre os mesmos, indicando que o gene Solyc11g010160.1.1 não deva a ser o fator de resistência a Fol raça 1.
- Esse resultado impõe a necessidade de buscar novos genes candidatos na região. A anotação do genoma do tomateiro vem se aperfeiçoando à medida que novas ferramentas de bioinformática e livrarias se tornam disponíveis.
- Vinte novas sequências foram recentemente catalogadas ao longo cromossomo 11 na proximidade da região alvo do presente trabalho. Desta forma, novas buscas de polimorfismos usando a informação derivada destes genes de resistência serão conduzidas para definir novos candidatos a potenciais fatores de resistência ao Fol raça 1.

PERSPECTIVAS

- Sequenciamento das linhagens parentais e análise *in silico* de polimorfismos – O sequenciamento do genoma completo dos dois parentais contrastantes será realizado pela TGAC Genome Analysis Center na Inglaterra. Será realizada a análise comparativa de polimorfismos para o cromossomo 11 entre os dois parentais.
- Estudos mais refinados com um maior número de marcadores em busca da comprovação da função de resistência a Fol dos genes candidatos.
- Validação de genes candidatos selecionados durante o mapeamento genético desses genótipos.
- Mapear a co-segregação com outros genes de interesse, como por exemplo *Sm*, de resistência as espécies de *Stemphylium*, auxiliando a piramidação de genes nos genótipos de interesse.
- Bolsa de Pós-doc no Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” – UMA – CSIC – Málaga na Espanha, para realização das atividades citadas.