

ANA CRISTINA PINTO JUHÁSZ

**IDENTIFICAÇÃO DE FONTE DE RESISTÊNCIA AO PepYMV EM
ACESSOS DE TOMATEIRO CULTIVADO E SILVESTRE DO BANCO DE
GERMOPLASMA DE HORTALIÇAS DA UFV, ANÁLISE DA HERANÇA DA
RESISTÊNCIA E ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NOS TECIDOS
INFECTADOS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL**

2006

ANA CRISTINA PINTO JUHÁSZ

**IDENTIFICAÇÃO DE FONTE DE RESISTÊNCIA AO PepYMV EM
ACESSOS DE TOMATEIRO CULTIVADO E SILVESTRE DO BANCO DE
GERMOPLASMA DE HORTALIÇAS DA UFV, ANÁLISE DA HERANÇA DA
RESISTÊNCIA E ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NOS TECIDOS
INFECTADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2006

Prof. Francisco Murilo Zerbini Jr.
(Conselheiro)

Prof. Pedro Crescêncio S. Carneiro
(Conselheiro)

Prof^a. Renata Maria Strozi A. Meira

Rosana Rodrigues

Derly José Henriques Silva
(Orientador)

Dedico,

Aos meus pais, Maria Albertina e Péter,

Ao meu irmão, Carlos Eduardo,

Ao meu companheiro, Bruno

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar meus caminhos e vencer mais uma etapa de vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela formação profissional e pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho.

Ao professor Derly José Henriques da Silva, pela orientação, amizade, ensinamentos e incentivos recebidos que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores conselheiros Murilo Zerbini Júnior e Pedro Carneiro, pelos valiosos ensinamentos nas suas áreas específicas de trabalho.

Aos professores das disciplinas cursadas que muito contribuíram para minha formação profissional.

Às professoras Rosana e Renata pelas contribuições e sugestões dadas na tese.

Aos amigos, aos colegas de curso, pela amizade e aos colegas do laboratório de Virologia Vegetal, pela dedicação e apoio.

Aos colegas do Núcleo em Estudos em Olericultura (NEO), pela convivência, amizade e auxílio na condução dos experimentos.

Aos funcionários do campo experimenta da Horta de Pesquisa da UFV pelo auxílio na condução dos experimentos.

A minha família pelo apoio, incentivo, amizade, compreensão e estímulo durante a minha caminhada.

Ao companheiro e amigo Bruno, que muito contribuiu na realização deste trabalho, tanto pela condução dos experimentos quanto pela amizade, carinho, apoio e dedicação em todos os momentos.

Ao meu pai pelas traduções dos textos em inglês.

Aos estagiários na condução e avaliação dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

BIOGRAFIA

Ana Cristina Pinto Juhász, filha de Maria Albertina Pinto Juhász e Péter Koppány Juhász, nasceu em São Paulo, em 27 de julho de 1977.

No período de 1995 a 2000, cursou Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, obtendo o grau de Engenheiro Agrônomo em Maio de 2000.

Cursou o Mestrado na área de Produção Vegetal na Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, no período de 2000 a 2002.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa em abril de 2002, sob a orientação do Prof. Derly José Henriques Silva, defendendo a tese em 21 de fevereiro de 2006.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL	3
2.1. O tomateiro.....	3
2.2. Viroses do tomateiro	5
2.2.1. Características do PepYMV	6
2.2.2. Infecção e movimentação viral.....	8
2.2.3. Alterações histológicas causadas por infecção viral	9
2.3. Métodos de controle	10
2.3.1. Resistência genética	10
2.3.2. Estudos de herança da resistência a viroses	11
2.3.2.1. Resistência recessiva a potyvírus	14
3. BIBLIOGRAFIA	18

CAPÍTULO I

Avaliação de acessos de <i>Lycopersicon</i> sp. do BGH-UFV quanto a resistência ao potyvirus PepYMV.....	23
RESUMO	24
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1. Identificação de fonte de resistência	30
2.2. ELISA indireto	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4. CONCLUSÃO.....	38
5. BIBLIOGRAFIA	39

CAPÍTULO II

Base genética da resistência de <i>L. hirsutum</i> ao potyvirus <i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV)	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1. Cruzamentos para obtenção do híbrido (F_1)	46
2.2. Obtenção das gerações segregantes F_2 e de retrocruzamentos ($RC_{1:1}$ e $RC_{1:2}$)	47
2.3. Herança da resistência.....	47
2.4. Avaliação de plantas da geração $F_{2:3}$	48
2.5. Análise dos resultados	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.1. Análise qualitativa	52
3.2. Análise quantitativa	53
3.3. Análise de médias	58
3.4. Avaliação de plantas da geração $F_{2:3}$	60
4. CONCLUSÃO.....	63
5. BIBLIOGRAFIA	64

CAPÍTULO III

Caracterização morfo-anatômica de folhas de tomateiro resistente e suscetível quando inoculadas com o potyvirus PepYMV	67
RESUMO	68
ABSTRACT	69
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAIS E MÉTODOS	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4. CONCLUSÕES	81
5. BIBLIOGRAFIA	82

RESUMO

JUHÁSZ, Ana Cristina Pinto, D.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Identificação de fonte de resistência ao pepYMV em acessos de tomateiro cultivado e silvestre do banco de germoplasma de hortaliças da UFV, análise da herança da resistência e alterações estruturais nos tecidos infectados.** Orientador: Derly José Henriques Silva. Conselheiros: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Pedro Crescêncio S. Carneiro.

A Identificação de fontes de resistência a doenças e o conhecimento do controle genético da resistência é um dos primeiros passos de um programa de melhoramento genético visando à obtenção de cultivares resistentes. O potivírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), recentemente identificado em plantas de tomateiro no Brasil, tem se disseminado rapidamente e possui potencial para se tornar um grave problema para a cultura do tomateiro no país. Este trabalho teve por objetivos identificar fontes de resistência ao PepYMV em 376 acessos de *Lycopersicon* sp. (*Solanum* sp.) do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (BGH-UFV), fazer um estudo da herança da resistência e investigar alterações nas folhas de tomateiro causadas pela infecção viral. Dos 355 acessos de *L. esculentum* (*Solanum lycopersicum*) do BGH-UFV inoculados com o PepYMV, nenhum deles foi considerado fonte segura de resistência, por conterem alta concentração viral quando avaliados por meio de ELISA indireto. Dentre os 21 acessos de espécies silvestres do gênero de tomateiro analisados, foi selecionado um acesso de *L. hirsutum* (BGH 6902), considerado resistente, por ser assintomático e não possuir infecção viral.

Foram avaliadas um total de 540 plantas das gerações P₁, P₂, F₁, F₂, RC_{1:1} e RC_{1:2}, obtidas a partir do cruzamento 'Santa Clara' x BGH 6902. As plantas foram inoculadas mecanicamente e a concentração viral de PepYMV em cada planta foi determinada pela leitura de absorvância obtida pelo teste de ELISA indireto. Considerando-se a taxa de segregação de plantas resistentes para suscetíveis tanto a hipótese de 1:3 e de 3:13 não foram significativas pelo teste do qui-quadrado, com $c^2=1,35$ para a hipótese de um gene recessivo e $c^2=0,69$ para a hipótese de dois genes com influência epistática e herdabilidade de 99%. No entanto, a hipótese de um gene foi confirmada pela autofecundação e avaliação de algumas plantas F₂ resistentes, concluindo-se com 98,32% de certeza de que apenas um gene recessivo está envolvido na resistência de *L. hirsutum* ao PepYMV. No acesso resistente assintomático (BGH 6902) não foram observadas alterações histológicas das folhas. Nas plantas de 'Santa Clara', os sintomas da doença foram severos, assim como nas plantas suscetíveis da geração F₂, nas quais a estrutura anatômica dos tecidos foliares foi bastante afetada. Nas plantas da geração F₁, apesar da expressão de sintomas amenos, não foi possível visualizar alterações em nível celular. Observou-se que o vírus causou sérios danos às folhas infectadas das plantas suscetíveis, tanto morfológica quanto anatomicamente, indicando a severidade da doença.

ABSTRACT

JUHÁSZ, Ana Cristina Pinto, D.S. Universidade Federal de Viçosa, February de 2006. **The identification of resistance sources to PepYMV in accessions of cultivated and wild tomato from the Vegetable Crops Germoplasma Bank of UFV, analysis the heritage and investigation of the structural alterations in infected tissues.** Adviser: Derly José Henriques Silva. Committee members: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Pedro Crescêncio S. Carneiro.

The identification of resistance sources to diseases and the knowledge of the genetic control of resistance is one of the first steps in a genetic improvement program aiming the obtention of resistant cultivars. The potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), recently identified in tomato plants in Brazil, has disseminated quickly and it has a potential to become a serious problem to the tomato cultivation in the country. This work had the aim to identify the resistance sources to PepYMV in 376 accessions of *Lycopersicon* sp. (*Solanum* sp.) from the Vegetable Crops Germoplasma Bank of UFV (BGH-UFV), to make a study of resistance heritage and to investigate the alterations on the tomato plant leaves caused by the viral infection. From the 355 accessions of *L. esculentum* (*Solanum lycopersicum*) from BGH-UFV, inoculated with the PepYMV, none of them was considered a safe source of resistance, for having a high viral content when evaluated by means of indirect ELISA. Among the 21 accessions on wild species of analyzed tomato plants, one accession of *L. hirsutum* (BGH 6902) was selected and considered resistant, for did not show any symptoms and for having no viral infection. A sum of 540 plants from the P₁, P₂, F₁, F₂, RC_{1:1}

and the RC_{1:2} generations was evaluated, obtained from the 'Santa Clara' x BGH 6902 intercrossing. The plants were inoculated mechanically and the viral concentration of PepYMV on each plant was determined by the absorbance reading obtained from indirect ELISA testing. Considering the segregation rate of resistant plants to the susceptible, the hypothesis of 1:3 as well as of 3:13 were not significant by the chi-square test, with $\chi^2 = 1,35$ for the hypothesis of a recessive gene and $\chi^2 = 0,69$ for the hypothesis of two genes with epistatic influence, and heritability = 99%. However, the hypothesis of only one gene was confirmed by the self fertilization and the evaluation of some plants resistant to F₂, it was concluded with 98,32% of certainty that only one gene is involved in the resistance of *L. hirsutum* to PepYMV. On the asymptomatic resistant access (BGH 6902) no histological alterations on the leaves were observed. On the 'Santa Clara' plants, the disease symptoms were severe, as well as on the susceptible plants from the F₂ generation, on which the anatomic structure of the leaf tissues was quite affected. On the F₁, generation plants, despite the slight expression of symptoms, it was not possible to visualize any alteration at a cell level. It was observed that the virus caused serious damages, morphologically as much as anatomically, to the infected leaves of susceptible plants, indicating the severity of the disease.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro possui grande importância econômica, sendo a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, sendo superada, em quantidade produzida, apenas pela cultura da batata. É também considerado um alimento nutracêutico, devido aos seus altos teores de potássio, vitaminas A, C e E, pigmentos como o licopeno e o beta-caroteno, entre outros (USDA, 2006). A estrutura química do licopeno confere marcante ação antioxidante, contribuindo na prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares e de certos tipos de câncer (Carvalho *et al.*, 2005).

A tomaticultura no Brasil vem se expandindo e modernizando nos últimos anos. Devido ao melhoramento genético, diversas cultivares têm sido lançadas para melhor atender as exigências do mercado consumidor. Desta forma, as cultivares vêm sendo melhoradas com objetivos principais de aumentar a produtividade e a qualidade dos frutos.

No entanto, os programas de melhoramento genético visando resistência a doenças devem ser incentivados, devido a alta suscetibilidade da cultura, que exige do produtor a aplicação constante de grandes volumes de agrotóxicos para que a produção comercial seja atingida. Dentre as principais doenças, as causadas por vírus têm sido um grande desafio para a tomaticultura.

No Brasil, as principais viroses que infectam o tomateiro são o vira-cabeça, causado por espécies do gênero *Tospovirus* (Pozzer *et al.*, 1996), e

o mosaico causado por espécies do gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae* (Ribeiro *et al.*, 2003). Uma nova espécie descrita a partir de plantas de pimentão (Inoue-Nagata *et al.*, 2002) vêm causando perdas de até 100% aos produtores de tomate do Espírito Santo (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004 e Ávila *et al.*, 2004). Essa virose, causada pelo potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), é disseminada com muita eficiência por afídeos vetores de maneira não-circulativa, em que o vírus fica restrito ao aparelho bucal do inseto, o que torna o controle químico dos insetos vetores ineficaz no combate a doença (Berger *et al.*, 2005).

Pelo exposto, o tomateiro necessita de investimentos na área de melhoramento genético para a obtenção de cultivares resistentes ao PepYMV. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos: (1) buscar fontes de resistência em acessos de *Lycopersicon* sp. pertencentes ao Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV, quanto à resistência à infecção pelo PepYMV; (2) a partir da identificação da fonte de resistência, estudar a herança da resistência mediante análise de média de gerações, para se conhecer parâmetros genéticos importantes da população oriunda do cruzamento entre a fonte selecionada e um cultivar comercial de tomateiro; (3) descrever a sintomatologia e as alterações estruturais causadas pela infecção viral nas folhas jovens de tomateiro do genótipo suscetível, do resistente, e das gerações F₁ e F₂.

2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1. O tomateiro

O tomateiro foi inicialmente classificado por Miller (1754) como pertencente ao gênero *Lycopersicon*. No entanto, uma nova classificação vem sendo sugerida por outros autores (Warnock, 1988; Spooner *et al.*, 1993). Estudos de dados moleculares de DNA de cloroplastos indicam uma grande proximidade genética entre a cultura do tomate, da batata e do pepino. Conseqüentemente, a maioria dos taxonomistas, e mais recentemente, melhoristas de plantas, estão adotando uma nova classificação para o tomate, como pertencente ao gênero *Solanum*. Desta forma, *Lycopersicon esculentum* passa a ser conhecido como *Solanum lycopersicon*, *L. hirsutum* como *S. habrochaites*, *L. peruvianum* como *S. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* como *S. pimpinellifolium*, *L. cheesmaniae* como *S. cheesmaniae*, entre outros, listados por Peralta *et al.* (2005).

O tomateiro destaca-se por sua importância econômica, sendo uma das hortaliças mais consumidas no mundo. A China é o maior produtor mundial, com cerca de 30 milhões de toneladas, porém sua produtividade é uma das mais baixas entre os principais países produtores (24 t/ha), em contraste com os Estados Unidos, que é o segundo maior produtor (12 milhões de toneladas), porém o que apresenta maior produtividade (74 t/ha). O Brasil é o nono produtor mundial de tomate e o maior produtor da América Latina. Em 2004, o Brasil produziu cerca de 3 milhões de toneladas de

tomate (FAO, 2006), com uma produtividade de 59 t/ha, sendo a região sudeste responsável por cerca de 50% de toda a produção (FNP, 2005).

O tomate e seus derivados, tais como sucos, sopas, molhos e 'catchups', são uma importante fonte de vitaminas, sendo um fruto de grande valor nutricional (Canene-Adams *et al.*, 2005). Possui alta concentração de potássio (237 mg/100g), de vitamina A (833 UI/100g) e C (12,7 mg/100g), e ainda minerais e pigmentos, dentre os quais o licopeno (10mg/100g) é um dos mais importantes (USDA, 2006). Devido a sua estrutura química, o licopeno figura como um dos melhores supressores biológicos de radicais livres, especialmente aqueles derivados do oxigênio (Carvalho *et al.*, 2005).

Entre uma série de carotenóides disponíveis no fruto de tomate, o licopeno é um dos antioxidantes mais eficientes, podendo doar elétrons para neutralizar as moléculas de oxigênio singleto e outras moléculas oxidantes antes que elas prejudiquem as células (Rao & Agawal, 2000). Estudos clínicos e epidemiológicos têm confirmado que dietas ricas em licopeno estão associadas com a redução do risco de desenvolvimento de câncer de próstata e ovário bem como a uma menor incidência de doenças degenerativas crônicas e cardiovasculares (Rao, 2002).

Considerando-se uma produção média de tomate no Brasil de 3 milhões de toneladas/ano, em que 65% é destinada ao consumo *in natura* e 35% para processamento industrial, pode-se dizer que são produzidas anualmente cerca de 1.500 t da molécula de licopeno na safra brasileira (assumindo teores médios de licopeno de 50 µg/g) (Carvalho *et al.*, 2005).

É interessante salientar que alguns trabalhos mais recentes indicam que a ingestão de licopeno presente no fruto do tomate é mais eficiente na

prevenção de certos tipos de câncer do que a administração do licopeno purificado via cápsulas (Boileau *et al.*, 2003).

2.2. Viroses do tomateiro

O tomateiro é suscetível a inúmeras doenças, o que causam perdas de produtividade e qualidade do fruto. Dentre estas, as viroses podem constituir fator limitante a produção comercial, devido principalmente à dificuldade de controle. Os prejuízos são variáveis e variam de região para região (Vale *et al.*, 2004).

Mais de 30 viroses podem infectar o tomateiro, sendo algumas delas transmitidas por nematóides, outras por insetos vetores e ainda outras mecanicamente (Jones, 1991). No Brasil, as principais viroses do tomateiro são o vira-cabeça, causado por espécies do gênero *Tospovirus* (Pozzer *et al.*, 1996) e o mosaico causado por espécies do gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae* (Ribeiro *et al.*, 2003). Porém mais uma espécie descrita a partir de plantas de pimentão, o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV, fam. *Potyviriidae*, gên. *Potyvirus*) (Inoue-Nagata *et al.*, 2002) infecta o tomateiro e pode ser fator limitante a produção.

A incidência do PepYMV em plantios de tomateiro vem aumentando no Brasil, com relatos recentes de perdas de até 100% no Espírito Santo. O PepYMV causa sintomas de mosaico severo, deformação foliar e nanismo das plantas de tomateiro (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004; Ávila *et al.*, 2004).

Em algumas regiões produtoras de São Paulo, a doença também vem se espalhando. Um levantamento recente indicou que 23% das plantas com sintomas de viroses coletadas e analisadas encontravam-se infectadas

pelo PepYMV (Palazzo *et al.*, 2004). Em Minas Gerais, um levantamento realizado em 2004 em diversas regiões do estado detectou a presença do PepYMV na região de Patos de Minas. De um total de 53 amostras coletadas naquela região, 18 amostras, representando 34% do total, estavam infectadas pelo PepYMV (Ferreira, 2005).

Em Patos de Minas, o PepYMV foi o vírus de ocorrência mais comum em tomateiro. Em conjunto, esses resultados indicam que o PepYMV está se disseminando rapidamente pela região Sudeste do Brasil e sugerem que a doença causada por esse vírus tem o potencial de se tornar um grave problema para a cultura do tomateiro no Brasil.

2.2.1. Características do PepYMV

O *Potyvirus* constitui o gênero mais numeroso de vírus de plantas, contendo aproximadamente 20% das espécies descritas (Fauquet *et al.*, 2005). Do ponto de vista econômico também é o mais importante, uma vez que as espécies virais pertencentes ao gênero são capazes de infectar mais de 2.000 espécies de plantas (Berger *et al.*, 2005).

Todas as espécies virais pertencentes ao gênero *Potyvirus* possuem características comuns, com partículas alongadas e flexuosas medindo de 680 a 900 nm de comprimento por 11 a 13 nm de diâmetro e genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples (ssRNA) de sentido positivo com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA viral possui uma proteína de origem viral ligada covalentemente à extremidade 5' (denominada VPg) e uma cauda poli-A na extremidade 3', sendo envolto por

aproximadamente 2.200 cópias de uma proteína capsidial com peso molecular em torno de 34 kDa (Berger *et al.*, 2005).

O genoma viral possui uma única fase de leitura (ORF) que dá origem a uma poliproteína com peso molecular superior a 350 kDa. Por autoproteólise, pelo menos 10 proteínas virais [P1, HC-Pro, P3, (*Helper Component-Proteinase*), CI (*Cylindrical Inclusion*), 6K₂, NIa (*Nuclear Inclusion a*), NIb (*Nuclear Inclusion b*) e CP (*Capsid Protein*)] são produzidas em quantidades estequiometricamente idênticas. As proteínas produzidas em excesso se acumulam na célula infectada na forma de inclusões, como a inclusão citoplasmática do tipo cata-vento, formada pelo acúmulo da proteína CI. O acúmulo de inclusões citoplasmáticas e nucleares nas células infectadas é uma das principais características das infecções causadas por potyvírus em plantas (revisado por Zerbini & Maciel-Zambolim, 1999).

As proteínas sintetizadas pelos potyvírus possuem caráter multifuncional, uma vez que quase todas as proteínas de função conhecida atuam em mais de um processo do ciclo de infecção. As proteínas CI, NIb, NIa (VPg-Pro), 6K₂, P1, HC-Pro e P3 estão relacionadas a replicação viral, sendo as duas primeiras as mais importantes no processo. A proteína 6K₂ tem a função de manter o complexo replicativo ancorado na membrana plasmática do hospedeiro. As proteínas VPg-Pro, P1 e HC-Pro são proteases virais, no entanto a VPg-Pro é a mais importante, por ser a responsável pela clivagem de todos os sítios da poliproteína, com exceção da proteína intermediária de 87 kDa, que é clivado pelos próprios terminais carboxílicos de P1 e HC-Pro. A CP forma o capsídeo e junto com a HC-Pro são as principais responsáveis pela movimentação viral célula-a-célula e a

longa distância, e ainda pela transmissão por afídeos (revisado por Revers *et al.*, 1999).

A transmissão de potyvírus de uma planta para outra é feita por inúmeras espécies de afídeos. Os afídeos adquirem o vírus ao se alimentarem da planta infectada, no momento da picada de prova. A transmissão ocorre de maneira não-circulativa, em que o vírus fica restrito ao aparelho bucal do inseto. Desta forma o controle químico é ineficaz, pois sob a ação de diversos inseticidas os insetos praticam inúmeras picadas de prova e com isto inoculam o vírus com maior eficiência. Além disso, há pouca especificidade entre o vírus e o inseto vetor, o que dificulta a seleção de inseticidas (Berger *et al.*, 2005).

2.2.2. Infecção e movimentação viral

A infecção ocorre quando o vírus é capaz de penetrar em uma célula hospedeira, por meio de ferimentos ou por meio de um inseto vetor, e o RNA viral se dissocia do capsídeo. A próxima etapa é a tradução da poliproteína, pelo redirecionamento da maquinaria de tradução da célula hospedeira a favor do RNA viral ao invés dos mRNAs celulares (Léonard *et al.*, 2002). Posteriormente, por meio de autoproteólise da poliproteína, são geradas todas as proteínas virais necessárias para todo o ciclo de infecção. Em seguida ocorrerá a replicação do RNA viral, que pode ser transportado para outras células ou formar novas partículas virais.

A infecção sistêmica da planta ocorre quando o vírus se movimenta célula-a-célula (curta distância) e a longa distância via floema. O movimento do RNA viral célula-a-célula ocorre pelo aumento do limite de exclusão dos

plasmodesmas, devido à interação das proteínas de movimento com o RNA viral. Desta forma, o complexo RNA viral com a proteína de movimento se move de uma célula para outra (Lucas, 2006).

O movimento sistêmico ocorre com a entrada do vírus no elemento de tubo crivado, transporte via floema e posterior retorno às células do mesófilo. Para atingir o sistema vascular o vírus deve atravessar as células da bainha, o parênquima floemático, as células companheiras e o elemento de tubo crivado. Desta forma ocorre a infecção sistêmica, uma vez que o vírus entra no sistema vascular da planta e segue o fluxo da rota de translocação de fotoassimilados no sentido fonte-dreno, infectando toda a planta (Lucas, 2006).

2.2.3. Alterações histológicas causadas por infecção viral

Devido a infecção viral, as plantas podem sofrer uma série de alterações fisiológicas, tais como o aumento da taxa respiratória, redução da atividade fotossintética e alterações do equilíbrio hormonal (Hinrichs-Berger *et al.*, 1999). Essas alterações bioquímicas são freqüentemente acompanhadas por alterações histológicas na planta, principalmente pela necrose de tecidos, hipoplasia ou ainda hiperplasia de células. Uma das organelas mais afetadas é o cloroplasto, devido à grande demanda por metabólitos fundamentais, como nucleotídeos e aminoácidos, utilizados em grande quantidade pelos vírus durante o processo replicativo (Hull, 2002).

As alterações em nível celular são muitas vezes decorrentes da rápida multiplicação viral nos tecidos das plantas infectadas. Esses efeitos podem ocorrer sozinhos ou em conjunto. De forma generalizada, os vírus

pertencentes a família *potyviridae* podem causar aumento desordenado de mitocôndrias ou ainda agregação destas estruturas. O volume da célula pode ser aumentado devido à expansão do citoplasma e a parede celular pode ser comprometida, culminando com um colapso da célula nos estágios finais de infecção (Zerbini & Maciel-Zambolim, 1999).

2.3. Métodos de controle

O controle de qualquer virose deve ser preventivo, uma vez que não há ainda substâncias capazes de impedir a replicação ou a movimentação do vírus na planta e que não traga prejuízos ao hospedeiro. No caso das potyviroses, o controle químico do inseto vetor é dificultado, tanto pela inespecificidade e pelo tipo de transmissão entre o vírus e o inseto vetor (não-circulativo), ou ainda pela ampla gama de hospedeiros do vírus. Desta forma, algumas práticas culturais são recomendadas, como o uso de mudas saudáveis, controle do inseto vetor, e evitar o plantio próximo a lavouras velhas de pimentão e tomate, para diminuir o risco de infecção viral (Lopes & Santos, 1994).

2.3.1. Resistência genética

A resistência genética é uma das poucas opções para que se obtenha um controle efetivo de viroses causadas por potyvírus. A resistência a doenças constitui um dos principais objetivos dos programas de melhoramento da maioria das espécies agrônômicas e olerícolas. Estima-se que 25% dos recursos destinados ao melhoramento convencional sejam

utilizados no desenvolvimento de variedades resistentes a doenças (Borém & Miranda, 2005).

No melhoramento genético do tomateiro, a maioria dos genes de resistência a patógenos atualmente empregados tem sido transferida via cruzamentos com espécies silvestres (Doganlar *et al.*, 1997, Vidavsky & Czosnek, 1998). Destas, *L. peruvianum* é considerada uma das mais importantes fontes doadoras de genes de resistência a doenças bem como de outras características de interesse agrônomo e nutricional (Stevens & Rick, 1986). Além desta espécie silvestre, *L. hirsutum* também têm sido utilizado como fonte doadora de resistência, mais especificamente de resistência recessiva para potyvirose (Parrella *et al.*, 2002).

Após a identificação da fonte de resistência, é de fundamental importância se conhecer a herança da resistência, para se definir o método de melhoramento mais adequado para a característica em questão. Desta forma, deve-se avaliar quanto da variação existente é de origem genética e ambiental, por meio de estimativa de parâmetros genéticos, pela análise de médias e de variâncias (Ramalho *et al.*, 1993).

2.3.2. Estudos de herança da resistência a viroses

Estudos de herança da resistência de *Lycopersicon* sp. a viroses vêm sendo desenvolvidos, principalmente para o vira-cabeça, causado por espécies do gênero *Tospovirus*, para o mosaico dourado, causado por geminivirus e para o mosaico Y, causado pelo vírus PVY (*Potato virus Y*) da família *Potyviriidae*. Na maioria dos casos, a resistência é qualitativa, sendo

governada por um ou dois genes (Boiteux & Giordano, 1993; Stevens *at al.*, 1992; Kasrawi, 1989).

Para tospoviroses, Boiteux & Giordano (1993) verificaram que a taxa de segregação de plantas de tomate resistentes para suscetíveis foi de 1:0, 1:1, 1:0 e 3:1, respectivamente, para as gerações: F₁, retrocruzamento para o genitor suscetível, retrocruzamento para o genitor resistente e F₂. Essas taxas de segregação sugeriram o modelo de um gene dominante para resistência.

Os dados de Boiteux & Giordano (1993) se assemelham aos relatados por Stevens *at al.* (1992), que avaliaram a herança da resistência a cinco isolados de TSWV, originários dos EUA. Pela taxa de segregação avaliada nas plantas das gerações F₁, retrocruzamento para o genitor suscetível, retrocruzamento para o genitor resistente e F₂, a resistência para os isolados testados também foi conferida por um gene dominante.

No estudo da herança da resistência ao geminivírus TYLCV em tomateiro, Pilowsky e Cohen (1974) utilizaram plantas de *L. pimpinellifolium* como genitor resistente. Quando as plantas da geração F₂ foram inoculadas, foram observadas plantas resistentes, intermediárias e suscetíveis na proporção de 1:2:1. As progênies dos retrocruzamentos para o genitor suscetível segregaram na razão de 1 intermediário : 1 suscetível, e os retrocruzamentos para o genitor resistente segregaram na proporção de 1 resistente : 1 intermediário. Neste caso a resistência ao TYLCV foi controlada por um único gene com dominância incompleta.

Kasrawi (1989) também utilizou plantas de *L. pimpinellifolium* como genitor resistente e constatou que a resistência foi controlada por um único

gene dominante, no entanto com dominância completa, diferentemente dos resultados observados por Pilowsky e Cohen (1974) em que todas as plantas da geração F₁ foram resistentes.

Hassan *et al.* (1984), relataram resistência recessiva ao TYLCV quando derivada de *L. cheesmanii*. Quando plantas de *L. hirsutum* foram utilizadas como genitor resistente, a resistência foi dominante e controlada por mais de um gene.

Vidavsky & Czosnek (1998), em cruzamentos de *L. esculentum* com *L. hirsutum*, observaram que a resistência ao TYLCV foi controlada por dois a três genes recessivos. Friedmann *et al.* (1998), trabalhando com uma linha resistente ao TYLCV (TY 172), oriunda de *L. peruvianum*, sugeriram uma resistência de dominância parcial e oligogênica. Os dados sugeriram um modelo de dois genes, um parcialmente dominante (AA), e outro recessivo (bb), em que cada um pode contribuir para a resistência, porém ambos controlados predominantemente e epistaticamente por um terceiro gene recessivo (cc). Assim, as plantas resistentes TY 172 devem ter o genótipo AAbbcc, enquanto que as suscetíveis, o genótipo aaBBCC.

Para a avaliação da herança da resistência de tomate ao PVY, Legnani *et al.* (1995) utilizaram um acesso de *L. hirsutum* (PI 247087) como genitor resistente, que não demonstrou qualquer sintoma durante as avaliações. No entanto, todas as plantas F₁ desenvolveram sintomas, assim como o genitor suscetível. De acordo com as taxas de segregação observadas, dois genes independentes recessivos foram responsáveis pela resistência desse acesso de *L. hirsutum*.

Vários genes de resistência de *Capsicum* a potyviroses, como o PVY, já foram identificados e vêm sendo utilizados em programas de melhoramento. Cook (1963) identificou um gene recessivo conferindo resistência a duas estirpes de PVY em cinco variedades de pimentão.

Gebre-Selassie *et al.* (1985) identificaram um alelo recessivo (*pvr2*) a partir de *C. annuum* 'Florida VR2' conferindo resistência às raças 0 e 1 de PVY e também ao TEV. No entanto, a complementação entre este gene e o *pvr6* (outro gene recessivo, identificado de *C. annuum* 'Perennial'), confere resistência completa ao potyvírus *Pepper veinal mottle virus* (Caranta *et al.*, 1996).

Boiteux *et al.* (1996) identificaram um gene de resistência dominante a raça1-2 de PVY quando derivada de *C. annuum* 'Crioulo de Morellos 334' e um gene recessivo quando derivada de *C. chinense* 'PI 159236'. Kyle & Palloix (1997) determinaram o alelo de resistência *pvr4* derivado também de *C. annuum* 'Crioulo de Morellos 334', sendo este resistente a todas as estirpes de PVY. Em tomateiro, não há relatos na literatura a respeito da herança da resistência ao PepYMV até este momento.

2.3.2.1. Resistência recessiva a potyvírus

Muitos genes recessivos conferindo resistência a viroses já foram identificados em diversas espécies de plantas. Desta forma, a resistência recessiva parece ser mais comum para viroses do que para outros patógenos, em que genes dominantes normalmente estão envolvidos na resistência (Fraser, 1990).

Para potyviroses, a resistência recessiva é mais comum do que em outras famílias de vírus, chegando a aproximadamente 50% dos genes de resistência identificados e caracterizados (Robaglia & Caranta, 2006). Esta resistência pode estar relacionada com a perda de fatores essenciais para a multiplicação do vírus na planta hospedeira (Diaz-Pendon *et al.*, 2004; Robaglia & Caranta, 2006).

Na literatura, citam-se dois mecanismos de resistência recessiva (Fraser, 1990; Robaglia & Caranta, 2006). A primeira hipótese propõe que a resistência seja derivada do resultado de um mecanismo passivo, onde a planta é resistente devido a falta de um fator específico do hospedeiro requerido pelo vírus para completar o ciclo de infecção, ou devido à presença de uma versão mutante desse fator incapaz de interagir com os fatores virais.

Na segunda hipótese, a resistência ocorre como resultado de um mecanismo ativo, no qual a planta resistente produz um inibidor que interfere com algum estágio do ciclo do vírus ou contém algum fator que reconhece alguma molécula codificada pelo vírus e então aciona uma ou mais respostas de defesa da planta. Neste caso, a suscetibilidade é devido a presença de um repressor do inibidor ou de um repressor da resposta de resistência (Diaz-Pendon *et al.*, 2004).

Resultados recentes do estudo de resistência recessiva a potyviroses indicam que a primeira hipótese é mais comum para esses patossistemas, sendo a segunda hipótese mais comum para interações entre plantas e fungos (Diaz-Pendon *et al.*, 2004; Robaglia & Caranta, 2006).

A clonagem e a caracterização de genes recessivos conferindo resistência a potyvírus já foi realizada em pimentão, alface e ervilha, para o *Potato virus Y* (PVY), o *Lettuce mosaic virus* (LMV) e o *Pea seedborne mosaic virus* (PSbMV), respectivamente (Ruffel *et al.*, 2002; Nicaise *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004). Em tomate, Ruffel *et al.* (2005) caracterizaram o gene recessivo *pot-1* conferindo resistência aos potyvírus *Tobacco etch virus* (TEV) e *Potato virus Y* (PVY).

Com a caracterização de vários genes de resistência a viroses, programas de melhoramento visando a introgressão de genes de resistência em cultivares comerciais vêm sendo desenvolvidos. Em pimentão, a utilização dos genes de resistência a potyvirose tem se destacado a partir da década de 90, com o lançamento do pimentão híbrido 'Magali R' (Agroflora/Sakata) que se tornou o líder do mercado brasileiro de pimentão naquela época, devido a qualidade de fruto associada a resistência ao PVY.

Outros híbridos também apresentaram resistência ao PVY, como o 'Acuario' (Asgrow) e 'Nathalie' (Rogers/Novartis Seed) e as cultivares Myr-10 e Myr-29. Estes híbridos e cultivares foram cultivados em larga escala por vários anos e regiões e mostraram resistência durável ao PVY (Echer & Costa, 2002).

Desde então, várias outras cultivares de pimentão com resistência ao PVY já foram lançadas no mercado, como por exemplo, os híbridos 'Bruna R', 'Dahra R', 'Magali R', 'Martha R' e 'Rubia R', da Agroflora (Sakata), a cultivar Ikeda e o híbrido 'Priscila', da Horticeres, que além de resistente ao PVY, é também ao PepYMV.

No melhoramento genético do tomateiro cultivado, a maioria dos genes de resistência a patógenos atualmente empregados tem sido transferida via cruzamentos com espécies silvestres (Doganlar *et al.*, 1997). Destas, *L. peruvianum* é considerada uma das mais importantes fontes doadoras de genes de resistência a doenças bem como de outras características de interesse agrônômico e nutricional (Stevens & Rick, 1986). Além desta espécie silvestre, *L. hirsutum* também têm sido utilizado como fonte doadora de resistência, mais especificamente de resistência recessiva para potyviroses (Parrella *et al.*, 2002).

3. BIBLIOGRAFIA

- ÁVILA, A.C.; IONUE-NAGATA, A.K.; COSTA, H.; BOITEUX, L.S.; NEVES, L.O.Q.; PRATES, R.S.; BERTINI, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.3, p.655-658, 2004.
- BERGER, P.H., ADAMS, M.J., BARNETT, O.W., BRUNT, A.A., HAMMOND, J., HILL, J.H., JORDAN, R.L., KASHIWAZAKI, S., RYBICKI, E.P., SPENCE, N., STENGER, D.C., OHKI, S.T., UYEDA, I., VAN ZAAYEN, A., VALKONEN, J.P. & VETTEN, H.J. Family Potyviridae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.819-841.
- BOILEAU, T.W.; LIAO, Z.M.; KIM, S.; LEMESHOW, S.; ERDMAN, J.W.; CLINTON, S.K. Prostate carcinogenesis in N-methyl-Nnitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed with tomato powder, lycopene, or energyrestricted diets. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 21, p.1578-1586, 2003.
- BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, v.71, p.151-154, 1993.
- BOITEUX, L. S.; CUPERTINO, F.P.; SILVA, C.; DUSI, A.N; MONTE-NESHICH, D.C.; VAN DER VLUGT, R.A A; FONSECA, M.E.N. Resistance to potato virus Y (pathotype 1-2) in *Capsicum annum* and *Capsicum chinensis* is controlled by two independent major genes. **Euphytica**, v. 87, p. 53-58, 1996.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. 4 ed. Viçosa: ed UFV, 2005. 525p.
- CANENE-ADAMS, K.; CAMPBELL, J.K.; ZARIPHEH, S.; JEFFERY, E. H.; ERDMAN JUNIOR, J.W. The Tomato As a Functional Food. **Journal Nutrition**,v.135, n.5, p.1226-1230, May 2005
- CARANTA, C.; LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 872-878, 1997.
- CARANTA, C.; PALLOIX, A., GEBRE-SELASSIE K.; LEFEBVRE, V.; MOURY, B., DAUBÉZE, A. M. A complementation of two genes originating from susceptible *Capsicum annum* lines confers a new and

- complete resistance to *pepper veinal mottle virus*. **Phytopathology**, v.86, p.739-743, 1996.
- CARVALHO, W.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, H.R.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B. Estimativa indireta de teores de licopeno em frutos de genótipos de tomateiro via análise colorimétrica. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.232, n.3, p.819-825, jul-set 2005.
- COOK, A. A. Genetics of response in pepper to three strains of potato virus Y. **Phytopathology**, v. 53, p. 720-723, 1963.
- DIAZ-PENDOM, J.A. TRUNINGER, V.; NIETO, C.; GARCIA-MAS, J.; BENDAHMANE, A.; ARANDA, M. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. **Molecular Plant pathology**, v.5, n.3, p. 223-233, 2004.
- DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANSKESLEY, S.D. Production of interespecific F1 hybrids, BC1, BC2 and BC3 populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of peruvianum carrying new root-knot nematode resistance genes. **Euphytica**, v. 95, p. 203-207,1997.
- ECHER, M.M. & COSTA, C.P. Reaction of sweet pepper to the *Potato virus y* (PVY^m)¹ **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.309-314, abr/jun. 2002.
- FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Disponível em: <http://www.faostat.fao.org>. Acesso em: 16 jan.2006.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005. 1259p.
- FERREIRA, S.S.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Occurrence of begomoviruses and satellite DNAs in weeds and tomato plants in Southeastern Brazil. In: 34TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (Abstracts on CD-Rom), Águas de Lindóia, SP. **Anais**. 2005.
- FNP **Consultoria & Agroinformativo**. AGRIANUAL 2005: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p.495-500.
- FONTES, P.C.R.; SILVA, D.J.H. **Produção de tomate para mesa**. Editora Aprenda Fácil, Viçosa, 2002. 196p.
- FRASER, R.S.S. The genetics of resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p. 179-200, 1990.
- FRIEDMANN, M.; LAPIDOT, M.; COHEN, S.; PILOWSKY, M. A novel source of resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus exhibiting a simtomless reaction to viral infection. **Journal American Horticultural Science**, v.123, n.6, p. 1004-1007, 1998.

- GAO, Z., JOHANSEN, E., EYERS, S., THOMAS, C.L., NOEL ELLIS, T.H. & MAULE, A.J. The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. **Plant Journal**, v. 40, p. 376-385, 2004.
- GEBRE-SELASSIE K.; MARCHOUX, G. DELECOLLE, B.; POCHARD, E. Variabilité des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Characterization et classification en pathotypes. **Agronomie**, v. 5, p. 621-630, 1985.
- HASSAN, A. A.; MAZAYD, H. M.; MOUSTAFA, S. E.; NASSAR, S. H.; NAKHLA, M. K. & SIMS, W. L. Inheritance of resistance to tomato yellow leaf curl virus from *Lycopersicon cheesmanii* and *Lycopersicon hirsutum*. **HortScience**, v. 19, n.4, p. 574-575, 1984.
- HINRICHS-BERGER, J.; BERGER, M.H. E BUCHENAUER, H. Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, n.3, p. 143-150,1999.
- HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. Fourth Edition, Academic Press, 2002.1001p.
- INOUE-NAGATA, A.K., FONSECA, M.E.N., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S., MONTE, D.C., DUSI, A.N., ÁVILA, A.C.; VAN DER VLUGT, R.A.A. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. **Archives of Virology**, v.147, p.849-855, 2002.
- JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. (Eds.) **Compendium of Tomato Diseases**. St. Paul, MN, EUA: The American Phytopathological Society. 1991. 73p.
- KASRAWI, M. A. Inheritance of resistance to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Plant Disease**, v. 73, n.5, p. 435-437, 1989.
- KYLE, M.M.; PALLOIX, A. Proposed revision of nomenclature for Potyvirus resistance genes in *Capsicum*. **Euphytica**, v.97, p.183-188, 1997.
- LEGNANI, R.; SELASSIE, K.G.; WOMDIM, R.N.; GOGNALONS, P.; MORETTI, A. Evaluation and inheritance of the *Lycopersicon hirsutum* resistance against potato virus Y. **Euphytica**, v.86, p. 219-226, 1995.
- LÉONARD, S.; CHISHOLM, J.; LALIBERTÉ, J.; SANFAÇON, H. Interaction in vitro between the proteinase of Tomato ringspot virus (genus Nepovirus) and the eukaryotic translation initiation factor iso 4E from *Arabidopsis thaliana*. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2085-2089, 2002.
- LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**, EMBRAPA-SPI, Brasília, DF, 1994. 61p.

- LUCAS, W.J. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. **Virology**, v. 344, p. 169-184, 2006.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E.; CAPUCHO, A.S.; ÁVILA, A.C.; IONUE-NAGATA, A.K.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, H. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do espírito santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n.3, p.325-327, 2004.
- MILLER, P. **The gardeners dictionary**, abridged 4th ed. London, UK, 1754.
- NICAISE, V.; GERMAN-RETANA, S.; SANJUÁN, R.; DUBRANA, M.; MAZIER, M.; MAISONNEUVE, B.; CANDRESSE, T.; CARANTA, C.; LeGALL, O. The eucaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1272-1282, 2003.
- PALAZZO, S.R.L.; BERGMANN, J.C.; CHAVES, A.R.; CHAVES, M.; CHARGAS, C.M.; COLARICCIO, A. Surto de potyvirus associado ao mosaico amarelo de tomateiro no Estado de São Paulo, **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.30, p.117, 2004. Resumo.
- PARRELLA, G.; RUFFEL, S.; MORETTI, A.; MOREL, C.; PALLOIX, A. CARANTA, A. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon spp.*) and pepper (*Capsicum spp.*) genomes. **Theoretical Applied Genetic**, v.105, p. 855–861, 2002.
- PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, v.30, n.2, p. 424–434, 2005.
- PILOWSKY, M.; COHEN, S. Inheritance of resistance to tomato yellow leaf curl virus in tomatoes. **Phytopathology**, v. 64, p. 632-635, 1974.
- POZZER, L.; RESENDE, R.O.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; GIORDANO, L.B.; AVILA, A.C. Tospovirus, uma visão atualizada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.95-148, 1996.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Genética quantitativa em plantas autógamas**. Editora da UFG, Goiânia, 1993. 271p.
- RAO, A.V. Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. **Experimental Biology and Medicine**, v.227, p.908-913, 2002.
- RAO, A.V.; AGAWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, n.5, p.563-569, 2000.
- REVERS, F.; GALL, O.L.; CANDRESSE, T.; MAULE, A. J. New Advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n.5, p. 367-376, 1999.

- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v.148, p.281-295, 2003.
- ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 40-45, 2006.
- RUFFEL, S.; DUSSAULT, M.; PALLOIX, A.; MOURY, B.; BENDAHMANE, A.; ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). **The Plant Journal**, v.32, p.1067–1075, 2002.
- RUFFEL, S.; GALLOIS, J.L.; LESAGE, M.L.; CARANTA, C. The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 274, p. 346-353, 2005.
- SPOONER, D. M.; ANDERSON, G. J.; JANSEN, R. K. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (solanaceae). **American Journal of Botany** , v.80, n.6, p.676-688, 1993.
- STEVENS, M.A.; RICK, C.M. Genetics and breeding. In p. ATHERTON, J.G.; RUDICH, J. **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. Chapman & Hall, London, 1986. p. 34-109.
- STEVENS, M.R.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, v.59, p. 9-17, 1992.
- USDA Nutrient Data Bank [Online]. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/>> Acesso em: 10 jul. 2006.
- VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M.; ALVARENGA, M.A.R. Manejo integrado das doenças do tomateiro: epidemiologia e controle. In: ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia**. Editora UFLA, 2004. 400p.
- VIDAVSKY, F.; CZOSNEK, H. Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. **Phytopathology**, v.88, n.9, p. 910-914, 1998.
- WARNOCK, S.J. A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. **HortScience**, v. 23, n.4, p.669-673, Aug. 1988.
- ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A Família Potyviridae - Parte I. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.1-66, 1999.

CAPÍTULO I

**Avaliação de acessos de *Lycopersicon* sp. do BGH-UFV quanto a
resistência ao potyvirus PepYMV**

RESUMO

O potívirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), recentemente identificado em plantas de tomateiro no Brasil, tem se disseminado rapidamente e possui potencial para se tornar um grave problema para a cultura do tomateiro no país. O presente estudo teve como objetivo avaliar 376 acessos de *Lycopersicon* sp. do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (BGH-UFV), visando identificar fontes de resistência ao potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. As plantas foram conduzidas individualmente em vasos plásticos de 1 litro. Plantas de *Nicotiana debneyi* infectadas com o isolado 3 do PepYMV (Truta *et al.* 2004) foram utilizadas como fonte de inóculo. A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado. Os acessos foram inoculados no estágio de duas a quatro folhas definitivas e reinoculados 48 e 72 horas após a primeira inoculação, para minimizar a incidência de escapes. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e avaliadas visualmente até o surgimento de sintomas. Todas as plantas assintomáticas foram testadas por ELISA indireto (Clark *et al.*, 1986) utilizando-se anti-soro policlonal produzido contra o isolado 3 do PepYMV (Truta *et al.*, 2004). Dos 355 acessos de *L. esculentum* do BGH-UFV inoculados com o PepYMV, 52 não apresentaram sintomas. No entanto, não foram considerados fonte segura de resistência por conterem

alta concentração viral quando avaliados por meio de ELISA indireto. Dentre os 21 acessos de espécies silvestres do gênero de tomateiro analisados, foi selecionado um acesso de *L. hirsutum* (BGH 6902), considerado resistente por ser assintomático e possuir baixa concentração do vírus. Este acesso pode ser indicado para ser utilizado em programas de melhoramento com o objetivo de incorporar resistência a esta virose em cultivares comerciais de tomate.

ABSTRACT

The potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), recently identified in tomato plants in Brazil, has disseminated quickly and it has a potential to become a serious problem to the tomato cultivation in the country. This work aimed to evaluate 376 accessions of *Lycopersicon* sp. from UFV's Vegetable Crops Germplasm Bank (BGH-UFV), to find out sources of resistance to the potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). The experiments were performed in greenhouse of the Federal University of Viçosa at the Department of Phytopatology. It was used the experimental outline entirely randomized with five repetitions. The plants were led individually in one-liter plastic pots. Plants of *Nicotiana debneyi* infected with PepYMV isolate 3 (Truta *et al.* 2004) were used as a inoculum source. The inoculation was carried out via buffer vegetable extract. The accessions were inoculated on the plants was of two to four definitive leaves and reinoculated 48 and 72 hours after the first inoculation, in order to minimize the incidence of escapes. The plants were kept in a greenhouse and visually evaluated until the symptoms appeared. All the asymptomatic plants were tested by indirect ELISA (Clark *et al.*, 1986), using policlonal anti-serum produced against the PepYMV isolate 3 (Truta *et al.*, 2004). Out of 355 accessions of *L. esculentum* inoculated with PepYMV, 52 did not show any symptom. However, the virus reached high concentrations in the tissue as measured by indirect ELISA, and therefore they were not considered to be safe sources of

resistance. Among 21 accessions of wild *Lycopersicon* species, one (*L. hirsutum* BGH 6902) was shown to be resistant, with no symptoms and no viral replication as measured by indirect ELISA. This accession is suitable to be used in breeding programs with the objective of incorporating resistance to this viral disease in commercial tomato cultivars.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma cultura sujeita a incidência de várias doenças, incluindo-se as viroses, que dependendo do nível de resistência genética do cultivar podem se tornar fatores limitantes à produção (Kurozawa e Pavan, 1997). No Brasil, as principais viroses do tomateiro são o vira-cabeça, causado por espécies do gênero *Tospovirus* (Pozzer *et al.*, 1996), e o mosaico causado por espécies do gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae* (Ribeiro *et al.*, 2003).

O *Potyvirus* constitui o gênero mais numeroso de vírus de plantas, contendo aproximadamente 20% das espécies descritas (Fauquet *et al.*, 2005). São transmitidos por diversas espécies de afídeos de maneira não-circulativa, pois o vírus fica restrito ao aparelho bucal do inseto. Além disso, não há especificidade entre o vírus e o inseto vetor, o que dificulta a seleção de inseticidas. As partículas virais são alongadas e flexuosas, medindo de 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro, com genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, de sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos (Berger *et al.*, 2005).

A espécie *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV, fam. *Potyviridae*, gên. *Potyvirus*), descrita a partir de plantas de pimentão (Inoue-Nagata *et al.*, 2002), também infecta o tomateiro. A incidência do PepYMV em plantios de tomateiro vem aumentando no Brasil, com relatos recentes de perdas de até 100% no Espírito Santo (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004 e Ávila *et al.*, 2004).

A virose causada em tomateiro pelo PepYMV é uma doença severa, que causa mosaico intenso, deformação foliar, nanismo das plantas e redução da produção em tomateiro (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004). Sendo assim, torna-se urgente a identificação de genes de resistência a esta virose. O presente trabalho teve como objetivo buscar fontes de resistência em acessos de *Lycopersicon* sp. pertencentes ao Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV, quanto à infecção pelo PepYMV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Identificação de fonte de resistência

Para a identificação de fontes de resistência ao PepYMV foram avaliados 376 acessos de *Lycopersicon sp.* pertencentes ao BGH – UFV, sendo 355 de *Lycopersicon esculentum* (*Solanum lycopersicon*) (Tabela 1) e 21 acessos de espécies silvestres (Tabela 2) do gênero.

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Desta forma foram avaliadas 1880 plantas, e cada planta de cada acesso foi considerada uma parcela experimental. As plantas foram conduzidas individualmente em vasos plásticos de 1 litro.

Plantas de *Nicotiana debneyi* infectadas com o isolado 3 do PepYMV foram utilizadas como fonte de inóculo. O isolado viral foi obtido de planta de pimentão coletada no campo no município de Igarapé, estado de Minas Gerais (Truta *et al.* 2004).

A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio a 0,01% e utilizando Carborundum (600 mesh) como abrasivo (Truta *et al.*, 2004). Os acessos foram inoculados no estágio de duas a quatro folhas definitivas e reinoculados 48 e 72 horas após a primeira inoculação, para minimizar a incidência de escapes. Foram inoculadas as três folhas do ápice das plantas (as mais jovens) em cada inoculação. Como controle, uma planta de cada acesso foi inoculada apenas com a solução tampão.

Tabela 1. Acessos de *Lycopersicon esculentum* (*Solanum lycopersicon*)
avaliados pertencentes ao BGH – UFV.

Acessos	Acessos	Acessos	Acessos
BGH 24	BGH 991	BGH 2021	BGH 2115
BGH 55	BGH 992	BGH 2026	BGH 2116
BGH 83	BGH 993	BGH 2027	BGH 2117
BGH 121	BGH 994	BGH 2029	BGH 2118
BGH 160	BGH 997	BGH 2032	BGH 2119
BGH 161	BGH 1019	BGH 2033	BGH 2120
BGH 168	BGH 1211	BGH 2034	BGH 2121
BGH 184	BGH 1214	BGH 2035	BGH 2122
BGH 185	BGH 1254	BGH 2038	BGH 2124
BGH 186	BGH 1258	BGH 2039	BGH 2125
BGH 216	BGH 1282	BGH 2041	BGH 2127
BGH 218	BGH 1485	BGH 2046	BGH 2128
BGH 224	BGH 1490	BGH 2048	BGH 2129
BGH 225	BGH 1497	BGH 2049	BGH 2131
BGH 226	BGH 1498	BGH 2052	BGH 2132
BGH 227	BGH 1499	BGH 2054	BGH 2133
BGH 243	BGH 1532	BGH 2055	BGH 2134
BGH 246	BGH 1538	BGH 2057	BGH 2135
BGH 279	BGH 1706	BGH 2060	BGH 2138
BGH 320	BGH 1708	BGH 2062	BGH 2141
BGH 322	BGH 1985	BGH 2064	BGH 2144
BGH 327	BGH 1987	BGH 2065	BGH 2145
BGH 349	BGH 1988	BGH 2068	BGH 2148
BGH 351	BGH 1989	BGH 2069	BGH 2149
BGH 378	BGH 1990	BGH 2070	BGH 2152
BGH 406	BGH 1991	BGH 2071	BGH 2153
BGH 468	BGH 1992	BGH 2073	BGH 2165
BGH 489	BGH 1993	BGH 2074	BGH 2177
BGH 603	BGH 2000	BGH 2075	BGH 2178
BGH 606	BGH 2002	BGH 2077	BGH 2182
BGH 616	BGH 2003	BGH 2083	BGH 2183
BGH 674	BGH 2004	BGH 2086	BGH 2184
BGH 700	BGH 2006	BGH 2087	BGH 2185
BGH 773	BGH 2008	BGH 2091	BGH 2187
BGH 813	BGH 2009	BGH 2092	BGH 2188
BGH 850	BGH 2010	BGH 2095	BGH 2189
BGH 970	BGH 2011	BGH 2096	BGH 2192
BGH 975	BGH 2013	BGH 2098	BGH 2194
BGH 981	BGH 2014	BGH 2100	BGH 2197
BGH 985	BGH 2016	BGH 2105	BGH 2198
BGH 987	BGH 2017	BGH 2109	BGH 2202
BGH 988	BGH 2018	BGH 2110	BGH 2203
BGH 989	BGH 2019	BGH 2111	BGH 2205
BGH 990	BGH 2020	BGH 2114	BGH 2206

Tabela 1. (cont.)

Acessos	Acessos	Acessos	Acessos
BGH 2208	BGH 2320	BGH 3318	BGH 3494
BGH 2211	BGH 2321	BGH 3319	BGH 3495
BGH 2213	BGH 2322	BGH 3320	BGH 3496
BGH 2214	BGH 2323	BGH 3380	BGH 3497
BGH 2216	BGH 2324	BGH 3381	BGH 3498
BGH 2219	BGH 2325	BGH 3382	BGH 3499
BGH 2222	BGH 2326	BGH 3383	BGH 3500
BGH 2223	BGH 2327	BGH 3384	BGH 3501
BGH 2226	BGH 2328	BGH 3385	BGH 3502
BGH 2227	BGH 2329	BGH 3386	BGH 3503
BGH 2229	BGH 2330	BGH 3388	BGH 3504
BGH 2231	BGH 2332	BGH 3394	BGH 3505
BGH 2234	BGH 2333	BGH 3405	BGH 3506
BGH 2235	BGH 2334	BGH 3445	BGH 3507
BGH 2236	BGH 2335	BGH 3447	BGH 3508
BGH 2247	BGH 2336	BGH 3459	BGH 3509
BGH 2251	BGH 2337	BGH 3460	BGH 6842
BGH 2260	BGH 2338	BGH 3462	BGH 6843
BGH 2269	BGH 2339	BGH 3463	BGH 6844
BGH 2270	BGH 2342	BGH 3464	BGH 6846
BGH 2273	BGH 2343	BGH 3465	BGH 6847
BGH 2274	BGH 2345	BGH 3466	BGH 6850
BGH 2275	BGH 2348	BGH 3467	BGH 6852
BGH 2276	BGH 2362	BGH 3469	BGH 6853
BGH 2280	BGH 2364	BGH 3472	BGH 6856
BGH 2282	BGH 2369	BGH 3474	BGH 6857
BGH 2283	BGH 2370	BGH 3475	BGH 6859
BGH 2284	BGH 2390	BGH 3476	BGH 6860
BGH 2287	BGH 2393	BGH 3477	BGH 6861
BGH 2288	BGH 2395	BGH 3478	BGH 6863
BGH 2289	BGH 2402	BGH 3479	BGH 6866
BGH 2298	BGH 2419	BGH 3480	BGH 6867
BGH 2299	BGH 2420	BGH 3481	BGH 6868
BGH 2302	BGH 2442	BGH 3482	BGH 6870
BGH 2303	BGH 2447	BGH 3483	BGH 6874
BGH 2305	BGH 2468	BGH 3484	BGH 6875
BGH 2306	BGH 2482	BGH 3485	BGH 6877
BGH 2307	BGH 2500	BGH 3486	BGH 6878
BGH 2309	BGH 2705	BGH 3487	BGH 6889
BGH 2312	BGH 2765	BGH 3488	BGH 6890
BGH 2314	BGH 3007	BGH 3489	BGH 6893
BGH 2316	BGH 3008	BGH 3490	BGH 6897
BGH 2317	BGH 3115	BGH 3491	BGH 6898
BGH 2318	BGH 3307	BGH 3492	BGH 6979
BGH 2319	BGH 3317	BGH 3493	

Tabela 2. Acessos de *Lycopersicon* sp. (*Solanum* sp.) avaliados pertencentes ao BGH – UFV.

Acessos	Espécies
BGH 6837	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6845	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6876	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6881	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6882	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6883	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6884	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6895	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6896	<i>Lycopersicon</i> sp.
BGH 6899	<i>L.esculentum</i> v. <i>cerasiforme</i>
BGH 6900	<i>L.esculentum</i> v. <i>cerasiforme</i>
BGH 6901	<i>L. hirsutum</i>
BGH 6902	<i>L. hirsutum</i>
BGH 6903	<i>L. peruvianum</i>
BGH 6904	<i>L. peruvianum</i>
BGH 6905	<i>L. peruvianum</i>
BGH 6906	<i>L. peruvianum</i>
BGH 6908	<i>L. cheesmani</i>
BGH 6909	<i>L. pimpinelifolium</i>
BGH 6910	<i>L. pimpinelifolium</i>
BGH 6937	<i>L.esculentum</i> v. <i>cerasiforme</i>

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação telada, para evitar a incidência de insetos vetores, que poderiam contaminar as plantas com outros vírus. Foram feitas observações diárias das plantas a partir da segunda inoculação até o surgimento de sintomas, que ocorreu 15 dias após a primeira inoculação. As plantas foram avaliadas visualmente, observando-se a presença ou ausência da infecção viral. Com o objetivo de detectar infecções latentes, todas as plantas assintomáticas foram testadas por ELISA indireto (Clark *et al.*, 1986) utilizando-se anti-soro policlonal produzido contra o isolado 3 do PepYMV, gentilmente cedido por Truta (2002).

Os acessos que apresentaram resistência no ensaio preliminar foram reavaliados durante um período de tempo maior (30 dias) e com um número

maior de repetições (15 por acesso), repetindo-se o mesmo procedimento da primeira avaliação.

2.2. ELISA indireto

Para o ELISA foram coletadas duas a três folhas do ápice das plantas, que foram maceradas na proporção de 1 grama de tecido foliar fresco para 5 ml de tampão (p/v).

Foram utilizadas amostras de plantas sadias como controle negativo e amostras de plantas de *N. debneyi* infectadas com o isolado 3 do PepYMV como controle positivo.

Para a realização do teste, foi adicionado 100 µl de extrato vegetal em cada cavidade da placa, utilizando-se duas repetições por amostra, incubando-se as placas a 37°C por uma hora. Em seguida, as placas foram submetidas a um ciclo de lavagens, sendo lavadas três vezes, durante três minutos em cada lavagem, em tampão PBS-T (pH 7,4, com 0,1% de Tween 20). O excesso de tampão foi retirado batendo-se as placas em papel absorvente, e adicionando-se 100µl de anti-soro diluído em tampão PEP (1:10.000) por cavidade.

Na seqüência, efetuou-se uma nova incubação a 37°C por uma hora. Após novo ciclo de lavagens, foi distribuído 100µl do anticorpo conjugado à enzima fosfatase alcalina, diluído em tampão PEP (1:2.000), por cavidade. Desta vez, a incubação a 37°C ocorreu por um período de três horas.

Foi feito o último ciclo de lavagens e em seguida adicionou-se o substrato da enzima p-nitrofenol, na concentração de 10mg/10ml de tampão

do substrato. As placas foram incubadas por um período de 10 a 20 min, no escuro, à temperatura ambiente.

Após a reação enzimática, a intensidade de coloração foi medida em leitora *Titertek Multiskan Plus MK II*, a 405 nm. Valores de absorbância superiores a duas vezes a média do controle sadio foram considerados positivos quanto à presença de vírus, conforme metodologia utilizada no Laboratório de Virologia Vegetal da UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 355 acessos de *L. esculentum* (*Solanum lycopersicon*) inoculados com o PepYMV, 52 não apresentaram sintomas 15 dias após a inoculação. Estes acessos foram os seguintes:

BGH 24, 55, 83, 121, 184, 224, 225, 227, 406, 468, 813, 1497, 1499, 1532, 1538, 1990, 2032, 2049, 2074, 2086, 2087, 2110, 2144, 2206, 2247, 2251, 2280, 2345, 2420, 2447, 3318, 3405, 3477, 3484, 3485, 3486, 3488, 3493, 3494, 3505, 3507, 3508, 6843, 6844, 6860, 6861, 6868, 6870, 6874, 6877, 6878, 6889.

Entretanto, a detecção via ELISA indireto indicou a presença de vírus em infecção latente em todos esses acessos. Consequentemente, estes não podem ser indicados como fontes seguras de resistência.

A Infecção latente dificulta a seleção visual de cultivares ou acessos resistentes a viroses. A presença ou não de sintomas da doença em plantas infectadas são dependentes do isolado viral, da variedade testada a ainda das condições ambientais (Rowhani, 1997). Este tipo de infecção também ocorre em outros patossistemas, como relatado por Rowhani (1997) em certas cultivares de uvas resistentes a viroses, em cucurbitáceas resistentes a potyvirus (Oliveira *at al.*, 2000), entre outros.

Os acessos silvestres avaliados pertenciam às espécies *L. hirsutum*, *L. peruvianum*, *L. cheesmani* e *L. pimpinelifolium*. Dos 21 acessos testados, 12 não apresentaram sintomas visuais e nem infecção latente de acordo com o resultado do ELISA indireto (Tabela 3). Após reavaliação dos 12 acessos

assintomáticos, foi selecionado um acesso de *L. hirsutum* como fonte de resistência, em que os valores de concentração viral discriminado pelo ELISA foram equivalentes aos da planta sadia utilizada como controle negativo.

Tabela 3. Avaliação dos acessos silvestres por ELISA indireto em resistentes (R) ou suscetíveis (S), 30 dias após a primeira inoculação com o PepYMV.

Acessos	Espécies	ELISA	Avaliação
BGH 6837	<i>Lycopersicon</i> sp.	-	R
BGH 6845	<i>Lycopersicon</i> sp.	-	R
BGH 6876	<i>Lycopersicon</i> sp.	-	R
BGH 6881	<i>Lycopersicon</i> sp.	-	R
BGH 6882	<i>Lycopersicon</i> sp.	-	R
BGH 6883	<i>Lycopersicon</i> sp.	+	S
BGH 6884	<i>Lycopersicon</i> sp.	+	S
BGH 6895	<i>Lycopersicon</i> sp.	-	R
BGH 6896	<i>Lycopersicon</i> sp.	-	R
BGH 6899	<i>L.esculentum</i> v. <i>cerasiforme</i>	+	S
BGH 6900	<i>L.esculentum</i> v. <i>cerasiforme</i>	+	S
BGH 6901	<i>L. hirsutum</i>	-	R
BGH 6902	<i>L. hirsutum</i>	-	R
BGH 6903	<i>L. peruvianum</i>	+	S
BGH 6904	<i>L. peruvianum</i>	-	R
BGH 6905	<i>L. peruvianum</i>	+	S
BGH 6906	<i>L. peruvianum</i>	+	S
BGH 6908	<i>L. cheesmani</i>	-	R
BGH 6909	<i>L. pimpinelifolium</i>	+	S
BGH 6910	<i>L. pimpinelifolium</i>	-	R
BGH 6937	<i>L.esculentum</i> v. <i>cerasiforme</i>	+	S

Desta forma, foi possível selecionar apenas uma fonte de resistência originada de um acesso silvestre de tomateiro, que apesar de apresentar várias características de planta e fruto muito diferenciadas dos tipos cultivados comercialmente, possui facilidade de intercruzamento com *L. esculentum*, representando uma fonte promissora para ser empregada em programas de melhoramento genético de tomateiro visando o desenvolvimento de cultivares resistentes ao PepYMV.

4. CONCLUSÃO

Dos 355 acessos de *Lycopersicon esculentum* (*Solanum lycopersicon*) do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV avaliados, nenhum foi considerado resistente ao PepYMV. Desta forma, buscou-se fontes de resistência em acessos silvestres de *Lycopersicon*, que possuem base genética ampla, o que aumenta as possibilidades de se encontrar resistência. Dos 12 acessos silvestres resistentes, somente um de *L. hirsutum* (BGH 6902) foi considerado uma boa fonte de resistência ao PepYMV. A partir deste resultado, é necessário se investigar a herança da resistência do BGH 6902 ao PepYMV, para se definir o melhor método de melhoramento para a incorporação da resistência em cultivares elite de tomateiro.

5. BIBLIOGRAFIA

- ÁVILA, A.C.; IONUE-NAGATA, A.K.; COSTA, H.; BOITEUX, L.S.; NEVES, L.O.Q.; PRATES, R.S.; BERTINI, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.3, p.655-658, 2004.
- BERGER, P.H., ADAMS, M.J., BARNETT, O.W., BRUNT, A.A., HAMMOND, J., HILL, J.H., JORDAN, R.L., KASHIWAZAKI, S., RYBICKI, E.P., SPENCE, N., STENGER, D.C., OHKI, S.T., UYEDA, I., VAN ZAAYEN, A., VALKONEN, J.P. & VETTEN, H.J. Family Potyviridae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.819-841.
- CLARK, M.F.; LISTER, R.M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. **Methods in Enzymology**, v. 118, p.742-766, 1986.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005. 1259p.
- INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C., DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C.; VAN DER VLUGT, R.A.A. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. **Archives of Virology**, v.147, p.849-855, 2002.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas, São Paulo: Ceres, 1997. p. 690-719.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E.; CAPUCHO, H.C.A.S.; ÁVILA, A.C.; IONUE-NAGATA, A.K.; KITAJIMA, E.W. Surto Epidemiológico do Vírus do Mosaico Amarelo do Pimentão em Tomateiro na Região Serrana do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n.3, p.325-327, 2004.
- OLIVEIRA, V.B.; LIMA, J.A.A.; VALE, C.C.; PAIVA, W.O. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.628-636, 2000.
- POZZER, L.; RESENDE, R.O.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; GIORDANO, L.B.; AVILA, A.C. Tospovirus, uma visão atualizada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.95-148, 1996.

- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v.148, p.281-295, 2003.
- ROWHANI, A.; UYEMOTO, J. K.; GOLINO, D. A. A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll associated viruses. **Plant Disease**, v.81, p.799-801, 1997.
- TRUTA, A.A.C. **Identidade e Propriedade de isolados de Potyvirus Provenientes de *Capsicum* spp.** 2002. 68p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- TRUTA, A.A.C.; SOUZA, A.R.R.; NASCIMENTO, A.V.S.; PEREIRA, R.C.; PINTO, C.M.F.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.160-168, 2004.

CAPÍTULO II

Base genética da resistência de *L. hirsutum* ao potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV)

RESUMO

Para a incorporação de genes de resistência a doenças em cultivares elites, é de suma importância o conhecimento da base genética da resistência. Com o objetivo de estudar a herança da resistência ao potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) em tomateiro, foram avaliadas 540 plantas das gerações P₁, P₂, F₁, F₂, RC_{1:1} e RC_{1:2}, obtidas a partir do cruzamento entre a cultivar 'Santa Clara' e o acesso BGH 6902 (*L. hirsutum*), do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV resistente ao PepYMV. As plantas foram inoculadas mecanicamente e a concentração viral de PepYMV em cada planta foi determinada pela leitura de absorbância obtido pelo teste de ELISA indireto. Plantas com valores inferiores a duas vezes o controle negativo foram consideradas resistentes quanto a infecção viral. Considerando-se a taxa de segregação de plantas resistentes para suscetíveis, tanto a hipótese de 1:3 e de 3:13 não foram significativas pelo teste do qui-quadrado, com $\chi^2=1,35$ para a hipótese de um gene recessivo e $\chi^2=0,69$ para a hipótese de dois genes com influência epistática e herdabilidade de 99%. No entanto, a hipótese de um gene foi confirmada pela autofecundação e avaliação de algumas plantas F₂ resistentes, concluindo-se com 98,32% de certeza de que apenas um gene está envolvido na resistência de *L. hirsutum* ao PepYMV. Desta forma, recomenda-se o método dos retrocruzamentos para a incorporação deste gene de resistência em cultivares elite de tomateiro.

ABSTRACT

For the incorporation of resistance genes to diseases in elite cultivars, it is of prime importance the knowledge of the resistance's genetic basis. With the aim of studying the heritage of resistance to the potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) on tomato plants, 540 ones were evaluated, from the P₁, P₂, F₁, F₂, RC_{1:1} and the RC_{1:2} generations, obtained from the intercrossing between the 'Santa Clara' cultivar and the BGH 6902 (*L. hirsutum*) accession, from the UFV's Vegetable Crops Germplasma Bank (BGH-UFV), resistant to PepYMV. The plants were inoculated mechanically and the viral concentration of PepYMV in each plant was determined by the absorbance reading obtained from indirect ELISA testing. Plants with values lower than twice the negative control were considered resistant with respect to viral infection. Considering the segregation rate of resistant to susceptible plants, the hypothesis of 1:3 as well as of 3:13 were not significant by the chi-square test, with $\chi^2=1,35$ for the hypothesis of a recessive gene and $\chi^2=0,69$ for the hypothesis of two genes with epistatic influence with heritability = 99%. However, the hypothesis of only one gene was confirmed by the self fertilization and the evaluation of some plants resistant to F₂, it was concluded with 98,32% of certainty that only one gene is involved in the resistance of *L. hirsutum* to PepYMV. This way, it is recommended the backcross method for the incorporation of this resistance gene in elite cultivars of tomato.

1. INTRODUÇÃO

A virose causada em tomateiro pelo *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV, fam. *Potyviridae*, gên. *Potyvirus*) é uma doença severa, que causa mosaico intenso, deformação foliar, nanismo das plantas e redução da produção de frutos (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004; Ávila *et al.*, 2004; Palazzo *et al.*, 2004). Como controle, a resistência genética é o único meio seguro de se impedir que a doença se instale na lavoura causando prejuízos aos produtores.

Em tomate, fontes de resistência a diversas viroses têm sido relatadas mais comumente nas espécies silvestres de *Lycopersicon*, principalmente em *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium*, *L. chilense*, *L. cheesmani* e *L. hirsutum*, conferindo resistência ao TYLCV (Kasrawi *et al.*, 1988; Zakay *et al.*, 1991; Michelson *et al.*, 1994; Picó *et al.*; 1998; Vidavsky & Czosnek, 1998), ao TSWV (Smith, 1944, Hutton & Peak, 1953, Paterson *et al.*, 1989, Stevens *et al.*, 1992), ao PVY (Thomas & Mac Grath, 1988, Legnani *et al.*, 1995), entre outros.

Após a identificação das fontes de resistência, a identificação e clonagem do(s) gene(s) de resistência são as próximas etapas de um programa de melhoramento.

A clonagem e a caracterização de genes recessivos conferindo resistência a potyvírus já foi realizada em pimentão, alface e ervilha, para o *Potato virus Y* (PVY), o *Lettuce mosaic virus* (LMV) e o *Pea seedborne mosaic virus* (PSbMV), respectivamente (Ruffel *et al.*, 2002, Nicaise *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004). Em tomateiro, Ruffel *et al.* (2005) caracterizaram o gene recessivo

pot-1 conferindo resistência aos potyvírus *Tobacco etch virus* (TEV) e *Potato virus Y* (PVY).

No melhoramento genético do tomateiro, a maioria dos genes de resistência a patógenos atualmente empregados tem sido transferida via cruzamentos com espécies silvestres (Doganlar *et al.*, 1997, Vidavsky & Czosnek, 1998). Destas, *L. peruvianum* é considerada uma das mais importantes fontes doadoras de genes de resistência a doenças bem como de outras características de interesse agrônomo e nutricional (Stevens & Rick, 1986). Além desta espécie silvestre, *L. hirsutum* também têm sido utilizado como fonte doadora de resistência, mais especificamente de resistência recessiva para potyvirose (Parrella *et al.*, 2002).

Desta forma, diversas cultivares comerciais de tomateiro com resistência a viroses já foram lançadas no mercado, como vários híbridos da Agroflore/Sakata com resistência ao ToMV, ao ToRMV e ao ToSWV, e da Hortiçeres, resistentes ao TMV, ao ToMV e ao TYLCV, entre outros.

Para o PepYMV, foi identificado uma fonte de resistência em um acesso de *L. hirsutum* pertencente ao Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV), como descrito no capítulo anterior. Por esta ser uma virose recente na cultura do tomateiro, estudos sobre a base genética da resistência necessitam ser realizados para que seja possível a incorporação da resistência em cultivares comerciais. Este trabalho teve por objetivo avaliar a herança da resistência ao PepYMV em uma população formada a partir do cruzamento da cultivar suscetível Santa Clara e do acesso resistente de *L. hirsutum* (BGH 6902), para que se possa definir o melhor método de incorporação do(s) gene(s) de resistência em cultivares elite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Na primeira etapa do trabalho foi realizada a hibridação para obtenção do híbrido F_1 , das gerações segregantes F_2 e de retrocruzamentos ($RC_{1:1}$ e $RC_{1:2}$).

2.1. Cruzamentos para obtenção do híbrido (F_1)

Os híbridos F_1 foram obtidos pelo cruzamento da cultivar Santa Clara suscetível ao PepYMV e o acesso resistente de *L. hirsutum* (BGH 6902).

Para a realização dos cruzamentos os genitores foram cultivados em ambiente protegido, com 50 plantas do cultivar suscetível (P_1) e 10 plantas do acesso resistente (P_2), em que o acesso resistente foi utilizado como doador de pólen e o suscetível como genitor feminino. Os tratos culturais das plantas foram realizados de maneira convencional (Filgueira *et al.*, 2005)

A partir do início do florescimento, foi coletado pólen das flores do genitor masculino, sendo armazenado em cápsulas de gelatina, sob baixa temperatura ($4^{\circ}C$) e umidade. Os cruzamentos foram realizados fazendo-se a emasculação e, em seguida, a polinização nos botões florais do genitor feminino, no período da manhã, nos horários entre 6:00hs e 8:00hs. As flores que foram polinizadas artificialmente foram identificadas com fios de lã coloridas e protegidas com cápsulas de alumínio por três dias a fim de evitar contaminação por outro pólen. Quando maduros, os frutos dos cruzamentos foram colhidos, as sementes retiradas manualmente,

fermentadas por um período de 48 hs, lavadas, secas a temperatura ambiente e armazenadas em câmara fria, a 4 °C.

2.2. Obtenção das gerações segregantes F₂ e de retrocruzamentos (RC_{1:1} e RC_{1:2})

Para a obtenção dos retrocruzamentos, 50 plantas de P₁, 10 de P₂ e 30 de F₁ foram cultivadas em ambiente protegido, para a obtenção dos retrocruzamentos RC_{1:1} (retrocruzamento P₁ x F₁) e RC_{1:2} (retrocruzamento F₁ x P₂). A geração F₂ foi obtida pela autofecundação de F₁. Os cruzamentos foram realizados seguindo-se a mesma metodologia descrita para a obtenção da geração híbrida F₁.

2.3. Herança da resistência

Após a obtenção das seis gerações necessárias para o estudo: genitores (P₁ e P₂), o híbrido F₁, a geração segregante F₂ e os retrocruzamentos (RC_{1:1} e RC_{1:2}), as plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, com telado anti-afídeo, para evitar a contaminação das plantas com outros vírus, no período de maio a julho de 2005. Foram cultivadas 30 plantas de cada um dos genitores e do híbrido F₁, 250 plantas da geração F₂ e 100 plantas de cada geração de retrocruzamento (RC_{1:1} e RC_{1:2}), perfazendo-se um total de 540 plantas.

A inoculação das plantas foi feita mecanicamente, utilizando-se como fonte de inóculo plantas de *Nicotiana debney* infectadas com o isolado 3 do

PepYMV (Truta et al. 2004). A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio a 0,01% e utilizando Carborundum (600 mesh) como abrasivo (Truta et al., 2004). As plantas foram inoculadas por cinco vezes para minimizar a incidência de escapes, com um intervalo de 48hs entre cada inoculação. A primeira inoculação foi feita quando as plantas estavam no estágio de duas a quatro folhas definitivas. As inoculações foram feitas sempre nas três folhas do ápice das plantas (folhas mais jovens).

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e avaliadas diariamente, até o surgimento de sintomas. Todas as plantas foram avaliadas por ELISA indireto (Clark et al., 1986), 15 dias após a primeira inoculação, para se medir a concentração viral de cada planta.

Para o ELISA foram coletadas duas a três folhas do ápice das plantas, maceradas na proporção de 1 grama de tecido foliar fresco para 5 ml de tampão (p/v). Foram utilizadas amostras de plantas sadias não inoculadas como controle negativo e amostras de plantas de *N. debneyi* infectadas com o isolado 3 do PepYMV como controle positivo. Após a reação enzimática, a intensidade de coloração foi medida em leitora *Titertek Multiskan Plus MK II*, a 405 nm.

2.4. Avaliação de plantas da geração F_{2:3}

Para a confirmação do número de genes obtidos pelo estudo da herança da resistência, foi feita uma avaliação de 20 plantas da geração F_{2:3} obtidas de cada uma de 10 plantas resistentes da geração F₂, totalizando

200 plantas. A inoculação e a avaliação por meio de ELISA foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente, para avaliação das plantas quanto a resistência ao PepYMV.

2.5. Análise dos resultados

Os resultados foram avaliados tanto qualitativa quanto quantitativamente. No primeiro caso, as plantas foram consideradas resistentes ou não, de acordo com os resultados do teste de ELISA. Para tanto foi estabelecida a seguinte regra decisória: plantas cujos valores de absorvância foram duas vezes maiores ou iguais ao do controle negativo foram consideradas suscetíveis. Por outro lado, plantas com valores inferiores a duas vezes o controle negativo foram consideradas resistentes quanto a infecção pelo vírus PepYMV, conforme metodologia utilizada no Laboratório de Virologia Vegetal da UFV. Desta forma, foi feito o teste do qui-quadrado (χ^2) considerando a taxa de segregação de plantas resistentes para suscetíveis em cada geração avaliada. O qui-quadrado calculado (χ_c^2) foi estimado por meio da expressão:

$$\chi_c^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad , \text{ em que:}$$

O_i = número observado de indivíduos na i-ésima classe fenotípica;

E_i = número esperado de indivíduos na i-ésima classe fenotípica;

k = número de classes fenotípicas

Para a decisão de se aceitar ou não a hipótese de nulidade (H_0), o valor de c^2 calculado foi comparado com o valor de c^2 tabelado ao nível de 5% de significância, e grau de liberdade igual a $k-1$. Para a análise quantitativa, utilizou-se o programa computacional GENES (Cruz, 2001), em que a análise de médias e variâncias das gerações foi realizada com os valores obtidos pelo teste de ELISA referentes à concentração viral presente em cada planta de cada geração.

A partir da análise das variâncias das gerações foram obtidas as seguintes estimativas (Cruz *et al.*, 2004):

a) Variância ambiental ($\hat{\mathbf{s}}_{we}^2$): $\hat{\mathbf{s}}_{we}^2 = \hat{\mathbf{s}}_{P2}^2$

b) Variância fenotípica ($\hat{\mathbf{s}}_f^2$): $\hat{\mathbf{s}}_f^2 = \hat{\mathbf{s}}_{F2}^2$

c) Variância genotípica ($\hat{\mathbf{s}}_g^2$): $\hat{\mathbf{s}}_g^2 = \hat{\mathbf{s}}_{F2}^2 - \hat{\mathbf{s}}_{we}^2$

d) Variância aditiva ($\hat{\mathbf{s}}_a^2$): $\hat{\mathbf{s}}_a^2 = 2\hat{\mathbf{s}}_{F2}^2 - (\hat{\mathbf{s}}_{RC1:1}^2 + \hat{\mathbf{s}}_{RC1:2}^2)$

e) Variância devido aos desvios de dominância (\mathbf{s}_d^2): $\mathbf{s}_d^2 = \mathbf{s}_g^2 - \mathbf{s}_a^2$

f) Herdabilidade no sentido amplo (h_a^2): $h_a^2 = \frac{\hat{\mathbf{s}}_g^2}{\hat{\mathbf{s}}_{F2}^2}$

g) Herdabilidade no sentido restrito (h_r^2): $h_r^2 = \frac{\mathbf{s}_a^2}{\mathbf{s}_a^2 + \mathbf{s}_d^2 + \mathbf{s}_{we}^2}$

h) Número mínimo de genes envolvido na determinação do caráter (\mathbf{h}):

$$\mathbf{h} = \frac{R^2(1+0,5k^2)}{8\hat{\mathbf{s}}_g^2} \text{ e } k = \sqrt{\frac{2\mathbf{s}_d^2}{\mathbf{s}_a^2}}$$

i) Grau médio de dominância (baseado em médias) (GMD):

$$GMD = \frac{2\bar{F}_1 - (\bar{P}_1 + \bar{P}_2)}{\bar{P}_1 - \bar{P}_2}$$

Sendo: $\hat{S}_{P_2}^2$ = variância do P₂; $\hat{S}_{F_1}^2$ = variância do F₁; $\hat{S}_{RC_{1:1}}^2$ = variância do RC_{1:1}; $\hat{S}_{RC_{1:2}}^2$ = variância do RC_{1:2}; R² = amplitude total na F₂;

A análise das médias das gerações foi realizada pelo modelo aditivo-dominante, em que as variações nas médias foram atribuídas apenas aos efeitos da média dos homozigotos (m), do efeito aditivo (a) e do desvio de dominância (d). Os parâmetros genéticos foram estimados por meio do método dos mínimos quadrados ponderados, seguindo-se a metodologia descrita por Cruz *et al.* (2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise qualitativa

Foram detectados sintomas da virose em todas as plantas do genitor suscetível (P_1), demonstrando suscetibilidade de 'Santa Clara' ao PepYMV. Todas as plantas do genitor resistente (P_2) foram assintomáticas, como esperado. As plantas da geração F_1 foram suscetíveis ao PepYMV, uma vez que todas estavam com sintomas. Deve-se ressaltar que o mosaico na geração F_1 foi menos intenso do que no seu genitor suscetível. Já na geração F_2 , houve grande variação de sintomas, em relação a intensidade e a coloração dos mosaicos. As plantas assintomáticas e negativas para o teste de Elisa foram consideradas resistentes.

A taxa de segregação de plantas suscetíveis para resistentes foi de 1:0, 1:0, 1:1 e 3:1, respectivamente, para as gerações F_1 , $RC_{1:1}$, $RC_{1:2}$ e F_2 . Essa taxa de segregação indica que a resistência seja controlada por um gene recessivo, como foi confirmado pelo teste do qui-quadrado (χ^2), em que em todas as gerações avaliadas, o χ^2 calculado (respectivamente de 0, 0, 0,04 e 1,2 para F_1 , RC_1 , RC_2 e F_2) foram menores do que o χ^2 tabelado ao nível de 5% de significância ($\chi^2 = 3,841$) (Tabela 1).

Resistência controlada por um gene recessivo foi também relatada na literatura para PVY (outro potyvírus que infecta o tomateiro) por Thomas e Mac Grath (1988), quando utilizaram um acesso de *L. hirsutum* como doador

do gene de resistência. No entanto, no mesmo patossistema, Legnani *et al.* (1995) citaram dois genes recessivos controlando a resistência.

Tabela 1. Número de plantas suscetíveis e resistentes das gerações obtidas a partir do cruzamento de ‘Santa Clara’ x BGH 6902 e o teste do qui-quadrado (c^2)

Geração	N° de plantas			Hipótese	c^2
	Total	Suscetível	Resistente		
P ₁	30	30	0	1:0	0
P ₂	30	0	30	0:1	0
F ₁	30	30	0	1:0	0
RC ₁	100	100	0	1:0	0
RC ₂	100	51	49	1:1	0,04
F ₂	250	180	70	3:1	1,2

C^2 tab (1gl)=3,841

Desta forma, identificar um gene de resistência recessiva ao PepYMV em tomateiro é um resultado esperado, uma vez que a resistência recessiva é citada na literatura sendo mais comum para viroses de plantas do que para outros patógenos (Fraser, 1990). Especificamente para potyviroses, a resistência recessiva pode chegar a aproximadamente 50% dos genes de resistência já identificados e caracterizados (Robaglia & Caranta, 2006).

3.2. Análise quantitativa

O genitor resistente (P₂) obteve concentração viral média de 0,099, inferior ao controle negativo, confirmando a sua resistência. Além de menor média, P₂ expressou ainda variância bem inferior ao dos outros genitores, provavelmente por ser o único genótipo resistente, em que as concentrações obtidas por ELISA foram muito baixas. Por este motivo a variância ambiental

em F_2 foi estimada por meio da variância de P_2 , uma vez que P_1 , apesar de ser uma variedade comercial, apresentou maior variação de concentração viral. Foram observadas nas gerações F_1 , F_2 e $RC_{1:1}$ valores médios de concentração viral próximo ao do genitor suscetível (P_1), indicando maior suscetibilidade nessas gerações (Tabela 2). Observou-se ainda segregação transgressiva na geração F_2 tanto para suscetibilidade quanto para resistência, em que algumas plantas estavam com uma concentração viral máxima de 0,76 e outras com uma concentração mínima de 0,056, fora, respectivamente, dos limites superior e inferior dos genitores, indicando ter ocorrido manifestação de complementação gênica (epistasia). Desta forma, a variância na geração F_2 foi muito superior a dos outros genitores, devido numa mesma geração algumas plantas serem resistentes com baixíssima concentração viral e outras suscetíveis com alta concentração viral.

Tabela 2. Número de plantas avaliadas, médias e variâncias das gerações P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , $RC_{1:1}$ e $RC_{1:2}$ obtidas a partir do cruzamento ‘Santa Clara’ x BGH 6902, determinadas pela leitura de absorbância relativa a concentração viral de PepYMV nas folhas das plantas das diferentes gerações mediante o teste de ELISA

Geração	Nº plantas	Média	Variância
P_1	30	0,308313	0,004238
P_2	30	0,092257	0,000238
F_1	30	0,320433	0,006490
F_2	250	0,312724	0,030514
$RC_{1:1}$	100	0,315049	0,006055
$RC_{1:2}$	100	0,230292	0,015556
controle negativo		0,215789	0,003438

Houve variabilidade genética entre gerações, o que permitiu a estimação de parâmetros genéticos da população em estudo (Tabela 3). Verificou-se herança oligogênica, com herdabilidade próxima a 100% e pouca influência ambiental. Desta forma, a variância genotípica na população F₂ foi atribuída aos efeitos aditivos, devido a ausência da variância relacionada aos desvios de dominância (Tabela 4). Em outros patossistemas, resistência a viroses também têm sido governada por poucos genes, o que permite alta herdabilidade e pouca influência ambiental, no controle da resistência. Paran *et al.*, (1989) descreve que a herdabilidade da resistência de *Cucurbita* ao vírus *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) foi de 91%. Em *Capsicum*, a herdabilidade da resistência potyvirose variou de 90 a 96%.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para resistência ao PepYMV, avaliados a partir de plantas de tomate das gerações P₁, P₂, F₁, F₂, RC_{1:1} e RC_{1:2} do cruzamento 'Santa Clara' x BGH 6902.

Fontes de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	Prob.
Blocos	4	0,030825	0,007706		
Geração	5	1,9720	0,3944	12,26	0,00001*
Resíduo	530	8,7906	0,0166		
Total	539	10,7934			
C.V. (%)	14,31%				

Tabela 4. Estimativas dos parâmetros genéticos obtidos mediante análise das variâncias para resistência ao PepYMV, avaliados a partir de plantas de tomate das gerações P₁, P₂, F₁, F₂, RC_{1:1} e RC_{1:2} do cruzamento 'Santa Clara' x BGH 6902.

Parâmetros	Resistência ao PepYMV
Variância ambiental (σ_{we}^2)	0,000238
Variância fenotípica ($\sigma_{F_2}^2$)	0,030514
Variância genotípica (σ_g^2)	0,030277
Variância aditiva (\hat{S}_a^2)	0,039419
Variância de dominância (S_d^2)	0,0
Herdabilidade no sentido amplo (h_a^2)	99,22 %
Herdabilidade no sentido restrito (h_r^2)	99,40 %
Grau médio de dominância (GMD)	1,0
Número mínimo de genes (η)	1,59

Devido a grande variação de concentração viral na geração F₂, foi feita uma análise gráfica separando as plantas em classes, em relação a concentração viral de cada uma delas (Figura 1), para melhor compreensão dos resultados. Plantas com valores de concentração viral inferior a 0,15 foram consideradas resistentes e as demais suscetíveis.

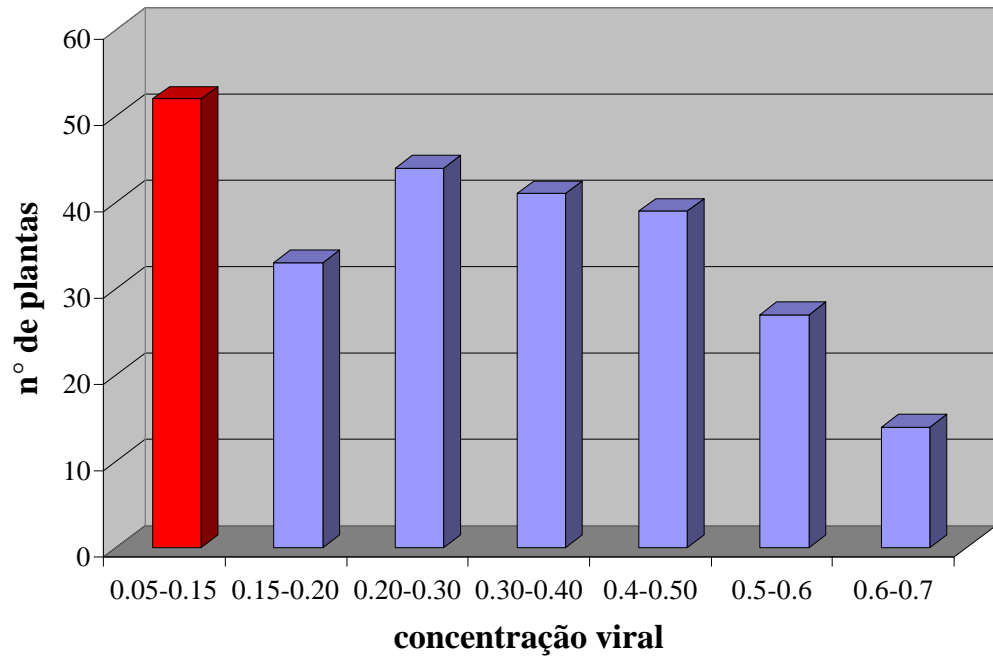


Figura 1. Plantas da geração F₂ do cruzamento de 'Santa Clara' x BGH 6902 separadas por classes em relação a concentração viral de cada uma delas. Barra vermelha: resistente; Barras azuis: suscetível

Foi feito o teste de qui-quadrado (χ^2) para a geração F₂ considerando-se a influência de epistasia e a hipótese que melhor se adequou aos dados foi a de taxa de segregação de plantas suscetíveis para resistentes de 13:3 (Tabela 5), com $\chi^2=0,69$. Desta forma, a resistência seria governada por dois genes, com influência epistática, do tipo recessiva e dominante. Neste caso, o genótipo de cada uma das gerações avaliadas seria representado da seguinte forma: P₁: AAbb; P₂: aaBB; F₁: AaBb; RC_{1:1}: (1) A_Bb : (1) A_bb; RC_{1:2}: (1)AaB_ : (1) aaB_; F₂: (9) A_B_ : (3) A_bb : (1) aabb : (3) aaB_. Destas, apenas as plantas com o genótipo aaBB e aaBb são consideradas resistentes.

Tabela 5. Teste de qui-quadrado (χ^2) para diferentes proporções fenotípicas em relação a resistência ao PepYMV na geração segregante F2, obtida a partir do cruzamento de ‘Santa Clara’ x BGH 6902

Frequência Observada		Hipótese	Frequência esperada		Teste χ^2	P %
Suscetível	Resistente		Suscetível	Resistente		
198	52	3:1	187,5	62,5	2,35 ^{ns}	12,5
		9:7	140,625	109,375	53,51*	0
		13:3	203,125	46,875	0,69 ^{ns}	40,6

X^2 tab (1; 0,05)= 3,841

3.3. Análise de médias

A partir da análise da média de gerações verificou-se que o modelo aditivo-dominante, com apenas os parâmetros m, a e d, foi adequado para explicar os efeitos gênicos envolvidos na herança da resistência, indicando que efeitos epistáticos não foram importantes no controle genético da característica avaliada, uma vez que o coeficiente de correlação entre as médias observadas e esperadas foi de 0,97 (Tabela 6).

A média também foi o parâmetro de maior estimativa, explicando cerca de 73% da variabilidade disponível, de acordo com a decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros. O efeito de aditividade foi superior ao de dominância (a=21% e d= 6%) (Tabela 7), e o grau médio de dominância (baseado em médias) foi igual a um, indicando dominância completa. Estes fatores indicam facilidade de identificação de genótipos geneticamente superiores, os quais podem proporcionar ganhos mais vantajosos em razão da seleção de plantas resistentes na geração F₂ (Cruz *et al.*, 2004).

Tabela 6. Médias observadas e esperadas para cada uma das gerações no modelo aditivo-dominante (m, a, d) para resistência ao PepYMV, determinada pela concentração viral nas folhas de tomate mediante o teste de ELISA, avaliados nas gerações P1, P2, F1, F2, RC1:1 e RC1:2 a partir do cruzamento 'Santa Clara' x BGH 6902

Geração	Média observada	Média esperada
P ₁	0,308	0,307
P ₂	0,092	0,093
F ₁	0,320	0,344
F ₂	0,313	0,272
RC _{1:1}	0,315	0,326
RC _{1:2}	0,230	0,219

r (média observada, média esperada) = 0,97

R² = 0,94

Tabela 7. Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros ajustados para resistência ao PepYMV, determinada pela concentração viral nas folhas de tomate mediante o teste de ELISA, avaliados nas gerações P1, P2, F1, F2, RC1:1 e RC1:2 a partir do cruzamento 'Santa Clara' x BGH 6902.

F.V.	R ² (%)
m/a,d	72,68
a/m,d	21,12
d/m,a	6,20
Total	100%

No modelo completo, apesar de não significativo, verifica-se 3,52% de variabilidade disponível é devido à epistasia (Tabela 8), principalmente devido a do tipo aditivo-aditivo (aa). Talvez essa pequena porcentagem esteja relacionada a epistasia de 13:3 diagnosticada pela hipótese de dois genes conferindo resistência.

Tabela 8. Coeficiente de Determinação (R^2) pela decomposição não ortogonal da soma de quadrados de parâmetros para o modelo completo: m,a,d,aa,ad,dd, avaliados em plantas de tomate das gerações P1, P2, F1, F2, RC1:1 e RC1:2 a partir do cruzamento 'Sta Clara' x BGH 6902

F.V.	R^2 (%)
m/a,d,aa,ad,dd	12,21
a/m,d,aa,ad,dd	83,89
d/m,a,aa,ad,dd	0,38
<i>Sub total</i>	<i>96,48</i>
aa/m,a,d,ad,dd	2,44
ad/m,a,d,aa,dd	0,57
dd/m,a,d,aa,ad	0,51
Total epistasia	3,52

3.4. Avaliação de plantas da geração $F_{2:3}$

As hipóteses de segregação 3:1 (indicando um único gene recessivo como responsável pela resistência) e 13:3 (que dois genes independentes determinam a resistência) não foram rejeitadas em nível de 5% de probabilidade pelo teste do qui-quadrado (Tabela 5). Cabe ressaltar que a hipótese de dois genes, com epistasia dominante e recessiva (13:3) apresentou maior nível de significância ($\alpha=40,6\%$) do que a hipótese de um gene (3:1, $\alpha=12,5\%$), indicando ser a hipótese de dois genes a mais indicada para explicar a herança da resistência de *L. hirsutum* ao PepYMV, com base nos dados quantitativos. Entretanto, de acordo com Shuster e Cruz (2004), seria necessária uma análise de no mínimo 660 plantas na geração F_2 para distinguir as duas razões de segregação a 5% de probabilidade.

Como alternativa a análise de um elevado número de plantas da geração F_2 , 660 no caso, para a distinção entre as duas hipóteses de segregação (13:3 e 3:1), foram avaliadas 200 plantas da geração F_3 , obtidas pela autofecundação de 10 plantas resistentes da geração F_2 . Não se observou sintomas em nenhuma das plantas da geração $F_{2:3}$ inoculadas e, ainda, o valor de concentração viral de todas essas plantas foi inferior ao controle negativo.

Com base na hipótese de dois genes, a probabilidade de ocorrência do genótipo resistente ser aaBB seria de 1/16 enquanto que de ser aaBb seria de 2/16, logo a probabilidade das plantas resistentes avaliadas serem do genótipo aaBB é de 1/3, enquanto que de ser aaBb é de 2/3. Como foram avaliadas 20 plantas de cada uma das 10 resistentes selecionadas em F_2 , o erro em se afirmar que dois genes estariam envolvidos na determinação da resistência é dado por $[1-(3/4)^{20} \times 2/3]^{10}$. Assim, a probabilidade ou certeza, em se afirmar que um único gene recessivo determina a resistência de *L. hirsutum* ao PepYMV é dado pela expressão $C = 1-[1-(3/4)^{20} \times 2/3]^{10}$ (Cruz *et al.*, 2001). Desta forma, a probabilidade em se afirmar que um único gene recessivo determina a herança da resistência é de 98,32%.

Estes resultados indicam ser a análise da geração $F_{2:3}$ de plantas resistentes para teste de segregação de importância em estudos de herança, haja vista a economia de tempo e recursos na realização do teste de ELISA indireto sem perda de eficiência na interpretação dos dados.

De acordo com o exposto, pode-se dizer de uma forma generalizada que a avaliação das plantas por ELISA é importante para se distinguir plantas resistentes das suscetíveis, descartando-se possibilidades de

infecção latente. No entanto, não é necessário se fazer uma análise da variação da concentração viral das plantas suscetíveis, pois uma vez infectadas, ocorre a infecção sistêmica e conseqüentemente a suscetibilidade, não interessando ao melhorista esta variação. Uma análise qualitativa já é o suficiente para interpretar os resultados e se estimar a herança da resistência.

Apesar do acesso silvestre utilizado apresentar várias características de planta e fruto muito diferenciadas dos tipos cultivados comercialmente, o que pode acarretar em maior tempo para o lançamento de cultivares com características desejáveis (Oliveira *et al.*, 2002), o fato de ser um gene recessivo governando a resistência facilita o trabalho do melhorista, uma vez que o método dos retrocruzamentos seria o mais indicado para a transferência do gene de resistência.

Neste caso, devido o alelo de resistência ser recessivo, o teste de progênie deve ser incluído no procedimento, para determinar a presença do alelo desejado durante o retrocruzamento. Segundo Fehr (1987), várias alternativas podem ser seguidas. Uma boa metodologia seria a autofecundação da primeira geração de retrocruzamento do híbrido F_1 com o genitor recorrente, para se identificar quais são portadores do alelo recessivo. Após a autofecundação e inoculação com o vírus, os indivíduos dominantes serão descartados, e os recessivos são novamente retrocruzados com o genitor recorrente, gerando indivíduos com o genótipo heterozigoto. Desta forma, repetem-se os procedimentos até se obter um nível de recuperação desejado de alelos do genitor recorrente.

4. CONCLUSÃO

A análise da segregação das plantas resistentes para suscetíveis na geração F_2 obtida a partir do cruzamento de 'Santa Clara' x BGH 6902 indicou que a resistência de *L. hirsutum* ao isolado 3 do potyvirus PepYMV é governada por apenas um gene recessivo, em que as plantas resistentes foram imunes, não possuindo sintomas e nem infecção latente. Este resultado foi ainda conformado pela autofecundação e avaliação de algumas plantas F_2 resistentes, podendo-se concluir com 98,32% de certeza de que realmente um gene está envolvido na resistência de *L. hirsutum* ao PepYMV.

Recomenda-se o método dos retrocruzamentos para a incorporação deste gene de resistência em cultivares elite de tomateiro, incluindo-se o teste de progênie com avaliação para resistência, com o objetivo de identificar as plantas com o genótipo de interesse (recessivo), que serão novamente retrocruzadas até se obter o nível de recuperação desejado do genitor recorrente.

5. BIBLIOGRAFIA

- ÁVILA, A.C.; IONUE-NAGATA, A.K.; COSTA, H.; BOITEUX, L.S.; NEVES, L.O.Q.; PRATES, R.S.; BERTINI, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.3, p.655-658, 2004.
- CLARK, M.F.; LISTER, R.M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. **Methods in Enzymology**, v. 118, p.742-766, 1986.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes Versão Windows: Aplicativo computacional em genética e estatística**, Viçosa: Editora UFV, 2001. 648p.
- CRUZ, C. D.; VIANA, J. M. S.; CARNEIRO, P. C. S. **Genética. Volume 2-GBOL-Software para ensino e aprendizagem de genética**, Viçosa: Editora UFV, 2001. 475p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético-Vol. 1**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 480p.
- DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANSKESLEY, S.D. Production of interespecific F1 hybrids, BC1, BC2 and BC3 populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of peruvianum carrying new root-knot nematode resistance genes. **Euphytica**, v. 95, p. 203-207, 1997.
- FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. New York: MacMillian, 1987. 525p.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Cultura e comercialização de hortaliças, 2^o edição. Viçosa: Editora UFV, 2005. 412 p.
- FRASER, R.S.S. The genetics of resistance to plant viruses. **Annual Review Phytopathology**, v.28, p. 179-200, 1990.
- GAO, Z.; JOHANSEN, E.; EYERS, S.; THOMAS, C.L.; NOEL ELLIS, T.H.; MAULE, A.J. The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. **Plant Journal**, v. 40, p. 376-385, 2004.
- HUTTON, E.M.; PEAK, A.R. Spotted wilt development in resistant and susceptible *Lycopersicon* species. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 4, p.160-167, 1953.

- KASRAWI, M.A.; SUWWAN, M.A.; MANSOUR, A. Sources of resistance to tomato yellow leaf curl virus in *Lycopersicon* species. **Euphytica**, v.37, p.61-64, 1988.
- LEGNANI, R.; SELASSIE, G.; WOMDIM, R.N.; GOGNALONS, P.; MORETTI, A. Evaluation and inheritance of the *Lycopersicon hirsutum* resistance against potato virus Y. **Euphytica**, v.86, p.219-226, 1995.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E.; CAPUCHO, H.C.A.S.; ÁVILA, A.C.; IONUE-NAGATA, A.K.; KITAJIMA, E.W. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.325-327, 2004.
- MICHELSON, I.; ZAMIR, D.; CZOSNEK, H. Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene Ty-1. **Phytopathology**, v.84, p.928-933, 1994.
- NICAISE, V.; GERMAN-RETANA, S.; SANJUÁN, R.; DUBRANA, M.; MAZIER, M.; MAISONNEUVE, B.; CANDRESSE, T.; CARANTA, C.; LeGALL, O. The eucaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1272-1282, 2003.
- OLIVEIRA, V.B.; QUEIROZ, M.A.; LIMA, J.A.A. Fontes de resistência em melancia aos principais potyvírus isolados de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 589-592, dez. 2002.
- PALAZZO, S.R.L.; BERGMANN, J.C.; CHAVES, A.R.; CHAVES, M.; CHARGAS, C.M.; COLARICCIO, A. Surto de potyvirus associado ao mosaico amarelo de tomateiro no Estado de São Paulo, **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.30, p.117, 2004. Resumo.
- PARAN, I.; SCIFRISS, C.; RACCAH, B. Inheritance of resistance to Zucchini yellow mosaic virus in the interspecific cross *Cucurbita maxima* × *C. ecuadorensis*. **Euphytica**, v. 42, n. 3, p. 227-232, 1989.
- PARRELLA, G.; RUFFEL, S.; MORETTI, A.; MOREL, C.; PALLOIX, A. CARANTA, A. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon spp.*) and pepper (*Capsicum spp.*) genomes. **Theoretical Applied Genetic**, v.105, p.855–861, 2002.
- PATERSON, R. G.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. **Euphytica**, v.43, p.173-178, 1989.
- PICÓ, B.; DÍEZ, M.J.; NUEZ, F. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. **Euphytica**, v.101, p.259-271, 1998.

- ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 40-45, 2006.
- RUFFEL, S.; DUSSAULT, M.; PALLOIX, A.; MOURY, B.; BENDAHMANE, A.; ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). **The Plant Journal**, v.32, p.1067–1075, 2002.
- RUFFEL, S.; GALLOIS, J.L.; LESAGE, M.L.; CARANTA, C. The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 274, p. 346-353, 2005.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. 568p.
- SMITH, P. Reaction of *Lycopersicon* spp. to *Spotted wilt virus*. **Phytopathology**, v.34, p.504-505, 1944.
- STEVENS, M.A.; RICK, C.M. Genetics and breeding. In p. ATHERTON, J.G.; RUDICH, J. **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. Chapman & Hall, London, 1986. p. 34-109.
- STEVENS, M.R.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, v.59, p.9-17, 1992.
- THOMAS, J.E.; MAC GRATH, D.J. Inheritance of resistance to potato virus Y in tomato. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.475-479, 1988.
- TRUTA, A.A.C.; SOUZA, A.R.R.; NASCIMENTO, A.V.S.; PEREIRA, R.C.; PINTO, C.M.F.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Identidade e propriedades de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.160-168, 2004.
- VIDAVSKY, F.; CZOSNEK, H. Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. **Phytopathology**, v.88, p.910-914, 1998.
- ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; KEDAR, N.; RABINOWITCH, H.; CZOSNEK, H.; ZAMIR, D. Screening *Lycopersicon* accessions for resistance to tomato yellow leaf curl virus: presence of viral DNA and symptom development. **Plant Disease**, v.75, p.279-281, 1991.

CAPÍTULO III

Caracterização morfo-anatômica de folhas de tomateiro resistente e suscetível quando inoculadas com o potyvirus PepYMV

RESUMO

A virose causada pelo potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), relatada inicialmente em plantas de pimentão, tem causado em tomateiro sintomas severos, decorrentes da rápida multiplicação viral nos tecidos das plantas infectadas, o que leva também a alterações histológicas de suas estruturas. O presente estudo teve por objetivo comparar genótipos suscetíveis e resistente de tomateiro quando inoculados com o PepYMV. Foi feita uma comparação das alterações visuais e histológicas de folhas da cultivar comercial suscetível Santa Clara, do acesso resistente de *L. hirsutum* do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (BGH 6902) e de plantas da geração F₁ e F₂ oriundas do cruzamento de 'Santa Clara' x BGH 6902. O vírus não causou infecção nas plantas resistentes e desta forma não houve sintomas e nem alterações em nível celular, tanto do acesso BGH 6902 como das plantas resistentes da geração F₂. Nas plantas da cultivar Santa Clara, os sintomas da doença foram severos, assim como nas plantas suscetíveis da geração F₂, nas quais a estrutura anatômica dos tecidos foliares foi bastante afetada. Nas plantas da geração F₁, apesar da expressão de sintomas amenos, não foi possível visualizar alterações em nível celular. Observou-se que o vírus causou sérios danos as folhas infectadas das plantas suscetíveis, tanto morfológica quanto anatomicamente, refletindo a severidade da doença.

ABSTRACT

The viral disease caused by the potyvirus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), formerly related in pepper plants, caused severe symptoms in tomato plants, resulting from the fast viral multiplication in the infected plants' tissues, which also leads to histologic alterations in their structures. The current study had the aim to characterize morphologically and anatomically leaves of susceptible and resistant types of tomato plants when inoculated with the PepYMV. A comparison was made between the visual and histological alterations on leaves of the 'Santa Clara' susceptible commercial cultivar, and the resistant access of *L. hirsutum* from the UFV's Vegetable Crops Germplasma Bank (BGH-UFV), from the F₁ and the F₂ generation originating from the 'Santa Clara' x BGH 6902 intersection. The virus did not cause any infection on the resistant plants and this way there were no symptoms neither any alteration on a cell level, of the BGH 6902 accession, as well as on the resistant plants from the F₂ generation. On the plants from the Santa Clara cultivar, the symptoms of the disease were severe, as well as on the susceptible plants from the F₂ generation, on which the anatomic structure of the leave tissues was quite affected. On the F₁ generation plants, despite the little symptom expression, it was not possible to visualize any alteration on a cell level. It was observed that the virus caused serious damages on the infected leaves of the susceptible plants, morphologically as well as anatomically, showing the severity of the disease.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma cultura suscetível à incidência de várias doenças. As viroses causam sérios prejuízos aos produtores, por haver poucos meios eficazes de controle além da resistência genética do cultivar. Dentre as diversas viroses que infectam o tomateiro, o mosaico amarelo causado pelo *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), uma nova espécie de potyvirus vêm causando perdas de até 100% aos produtores de tomate do Espírito Santo (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004 e Ávila *et al.*, 2004). A virose é disseminada com muita eficiência por afídeos de maneira não-circulativa, o que torna o controle químico dos insetos vetores ineficaz no combate a doença (Berger *et al.*, 2005).

Visualmente, as plantas de tomateiro infectadas com o PepYMV podem demonstrar sintomas de mosaico severo (caracterizado por regiões verde escuras e amareladas numa mesma folha), deformação foliar, nanismo das plantas e redução da produção (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004).

As doenças causadas por vírus podem ocasionar uma série de alterações fisiológicas nas plantas, tais como o aumento da taxa respiratória, redução da atividade fotossintética e alterações do equilíbrio hormonal (Hinrichs-Berger *et al.*, 1999). Essas alterações bioquímicas são freqüentemente acompanhadas por alterações histológicas na planta, principalmente pela necrose de tecidos, hipoplasia ou ainda hiperplasia de células. Uma das organelas mais afetadas é o cloroplasto, devido à grande demanda por metabólitos fundamentais, como nucleotídeos e aminoácidos,

utilizados em grande quantidade pelos vírus durante o processo replicativo (Hull, 2002).

As alterações em nível celular são muitas vezes decorrentes da rápida multiplicação viral nos tecidos das plantas infectadas. Esses efeitos podem ocorrer isoladamente ou em conjunto. De forma generalizada, os vírus pertencentes a família *Potyviridae* podem causar aumento desordenado de mitocôndrias ou ainda agregação destas organelas. O volume da célula pode ser aumentado devido à expansão do citoplasma e a parede celular pode ser comprometida, culminando com um colapso da célula nos estágios finais de infecção (Zerbini & Maciel-Zambolim, 1999).

Num estudo comparativo de cultivares de batata suscetível (cv. Quarta) e extremamente resistente (cv. Quirola) ao *Potato virus Y* (PVY), o vírus causou necrose nas nervuras e a nível citológico, houve degeneração das membranas e organelas citoplasmáticas na cultivar suscetível. Além disso, a parede celular foi severamente danificada. Em contrapartida, nenhuma alteração na epiderme foi observada. Na cultivar resistente, houve resposta hipersensível com deposição de calose ao redor das regiões necróticas, a fim de restringir a infecção na região inicialmente infectada (Hinrichs-Berger *at al.*, 1999). Para o PepYMV em tomateiro, nada foi ainda relatado na literatura.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar morfológica e anatomicamente folhas de tomateiro resistente e suscetível ao potyvirus PepYMV após inoculação com o vírus.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi conduzido um ensaio em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa com a cultivar Santa Clara, suscetível ao PepYMV, o acesso resistente de *L. hirsutum*, BGH 6902 do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV, o híbrido F₁ do cruzamento 'Santa Clara' x BGH 6902 e ainda plantas de geração F₂ obtidas por meio da autofecundação de F₁.

Foram inoculadas mecanicamente dez plantas da cultivar suscetível, do acesso resistente, do híbrido F₁ e 50 plantas da geração F₂ no estágio de duas a quatro folhas definitivas, utilizando-se como fonte de inóculo plantas de *Nicotiana debney* infectadas com o isolado 3 do PepYMV (Truta *et al.* 2004). A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio a 0,01% e utilizando Carborundum (600 mesh) como abrasivo.

Com o surgimento dos sintomas, 20 dias após a inoculação, foi coletada uma folha do ápice de cada planta, sendo que na geração F₂ foram coletadas folhas apenas das plantas sintomáticas. Cada folha foi seccionada em três partes (ápice, meio e base) e fixadas em FAA50 (formol:ácido acético glacial:etanol 50%, 90:5:5, v/v) por 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Para fins de controle foi adotado o mesmo procedimento, coletando-se amostras de folhas jovens de plantas não inoculadas de cada genótipo.

Para obtenção dos cortes, as amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas e emblocadas em resina plástica do tipo etileno glicol metacrilato (Historesin, Leica), preparada conforme instruções do fabricante. Foram feitos três blocos de cada genótipo, contendo uma amostra do ápice, do meio e da base da folha por bloco.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica). Os cortes transversais de 10 µm de espessura foram corados com azul de toluidina (O'Brien & McCully, 1981) por um período de 8 minutos. Após um período de secagem de 48 horas as lâminas foram montadas com resina sintética (Permount, Fisher).

A análise do laminário e a documentação fotográfica foram realizadas utilizando-se um microscópio fotônico (Olympus AX 70, TRF Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-PHOTO, acoplado a uma filmadora e microcomputador com analisador de imagens (Image Pro-Plus), no Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A folha de tomateiro é do tipo composta, com um grande folíolo terminal e cerca de 6 a 8 folíolos laterais, que também podem ser compostos. Os folíolos são lobados irregularmente e peciolados com bordos dentados (Alvarenga, 2004) (Figura 1A). Os bordos das folhas do acesso resistente são menos dentados do que do acesso suscetível (Figura 1B).

Uma característica comum na folha de tomateiro é a abundante presença de tricomas. São encontrados dois tipos principais de tricomas, os tectores e os glandulares. Os tectores podem ser uni ou pluricelulares, enquanto os glandulares são compostos por cabeça secretora e haste (Figura 2). Os glandulares são responsáveis pela produção de substâncias que conferem um odor característico da planta de tomate (TAH, 2005).

Numa observação apenas visual, notou-se uma maior quantidade de tricomas glandulares nas plantas do acesso resistente (*L. hirsutum*) do que no acesso suscetível (*L. esculentum*), assim como identificado por Leite *et al.* (1999), em que 90,31% dos tricomas eram do tipo tector em *L. esculentum* e 97,12% dos tricomas eram do tipo glandular em *L. hirsutum*. Na prática essa informação é bastante interessante, uma vez que plantas de *L. hirsutum* têm-se mostrado fonte promissora de resistência a uma grande variedade de insetos, devido a produção dos aleloquímicos 2-tridecanona (2-TD) e 2-undecanona (2-UD), presentes em exsudados produzidos pelos tricomas glandulares das folhas (Leite *et al.*,1999; Gilardón *et al.*,2001).

Desta forma a transmissão do vírus pode ser reduzida, devido a redução do ataque de insetos vetores nessas plantas.

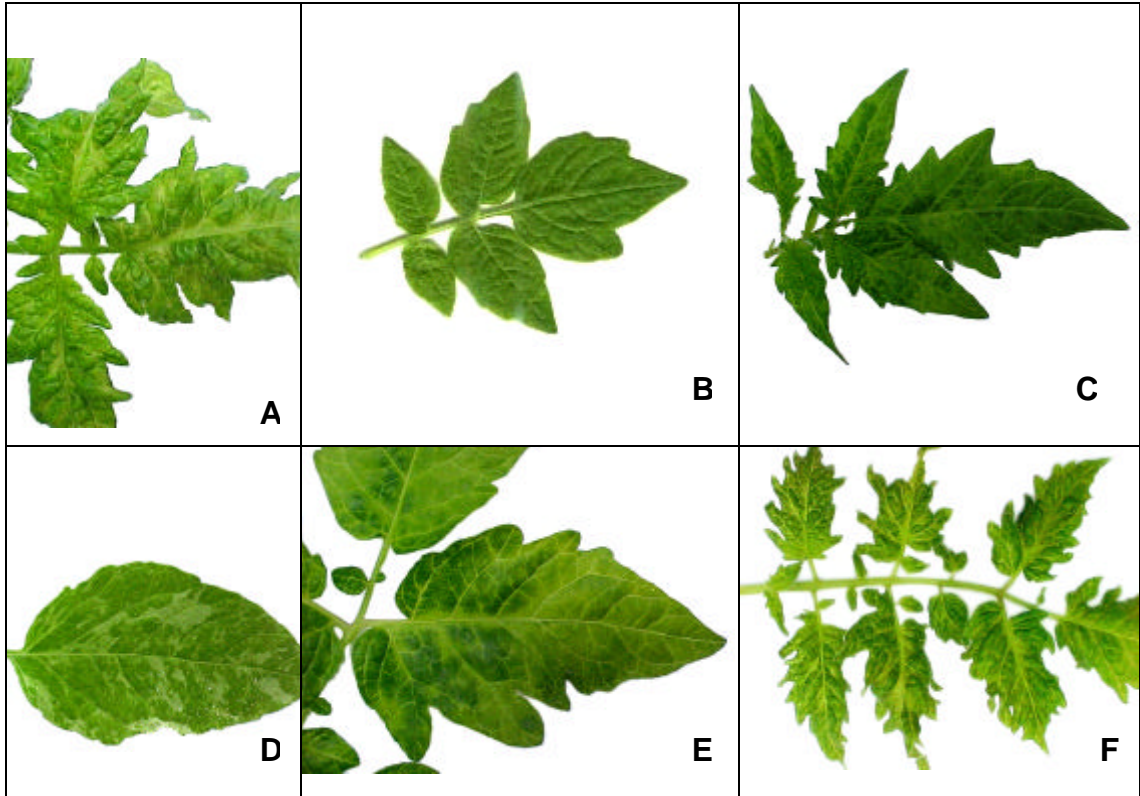


Figura 1. Variação de sintomas de mosaico em folhas de tomate 20 dias após a inoculação com o vírus PepYMV. A- Folha de tomate do genitor suscetível P_1 ('Santa Clara'). B- Folha de tomate do genitor resistente P_2 (acesso BGH 6902). C-Folha do híbrido F_1 obtido do cruzamento 'Santa Clara' x BGH 6902. D, E e F- Folhas de tomate da geração F_2 obtidas a partir da autofecundação de F_1

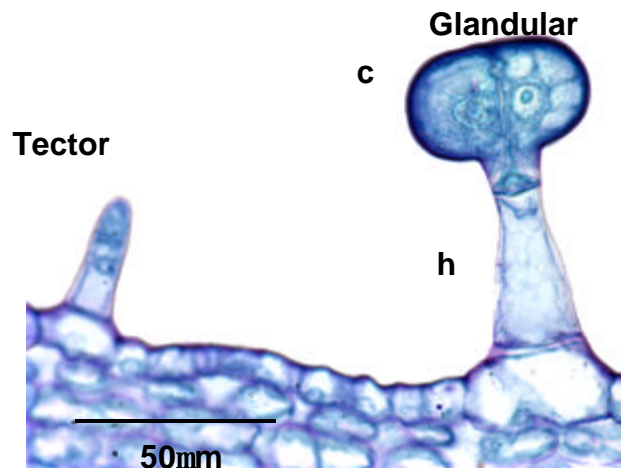


Figura 2. Tricomas tector e glandular da folha de tomateiro da espécie de *L. hirsutum*. O tricoma glandular é composto por cabeça secretora (c) e haste (h).

Após a inoculação com o PepYMV não houve sintomas no acesso resistente (BGH 6902). Já nas plantas da cultivar suscetível (Santa Clara), observaram-se sintomas evidentes de mosaico nas plantas. Na geração F_2 , houve grande variação de sintomas. Em algumas os sintomas foram pouco evidentes, enquanto em outras se observou mosaico intenso levando a deformação foliar. Os sintomas das plantas suscetíveis foram semelhantes aos já relatados na literatura por Maciel-Zambolim *et al.* (2004), em que a formação de mosaico intenso e a deformação foliar caracterizam os principais sintomas desta virose.

Não foram evidenciadas alterações estruturais na epiderme dos genótipos avaliados (Figura 3), assim como observado por Hinrichs-Berger *et al.* (1999) em folhas de batata infectada pelo PVY. As folhas de tomateiro são protegidas por uma fina cutícula (TAH, 2005), são recobertas por epiderme unisseriada e anfiestomáticas, sendo que na face abaxial os estômatos são numerosos, enquanto na adaxial são escassos (Alvarenga, 2004).

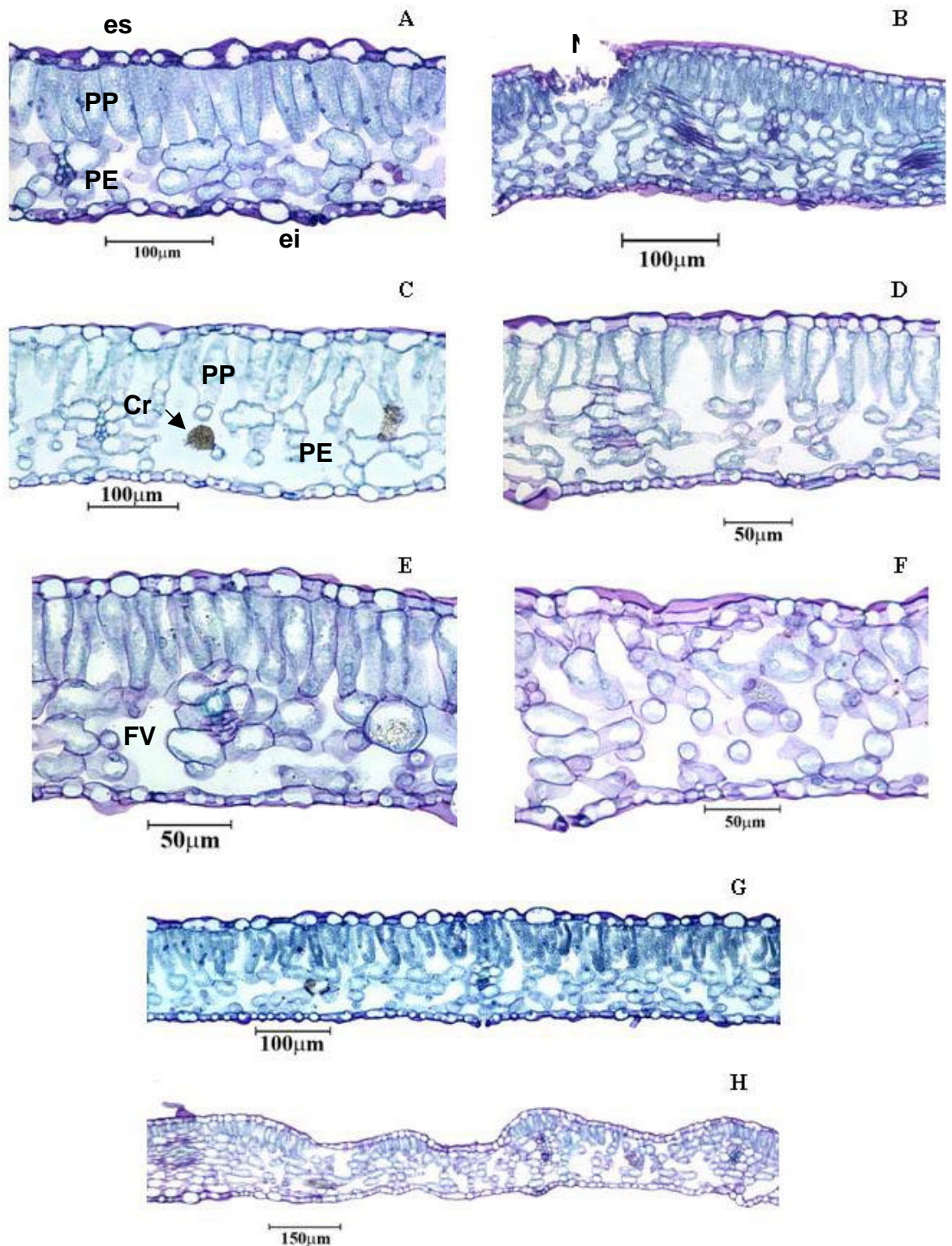


Figura 3. Alterações estruturais no mesofilo foliar de plantas de tomate 20 dias após a inoculação com o PepYMV. A- controle da cultivar suscetível Santa Clara. es=epiderme superior, ei=epiderme inferior, PP=parênquima paliçádico, PE=parênquima esponjoso. B- 'Santa Clara' infectada. N=nerose C-controle do acesso resistente. Cr=Cristais de Oxalato de Cálcio. D- 'BGH 6902' inoculado. E- Híbrido F₁ inoculado. FV= feixe vascular. F- Geração F₂ infectada. G- 'Santa Clara' controle. H- Geração F₂ infectada.

Logo abaixo da epiderme, se encontra o mesofilo foliar, que é composto por dois tipos de células. Tanto na folha de 'Santa Clara' (*L. esculentum*) quanto na do acesso resistente (*L. hirsutum*), o mesofilo é constituído por uma camada de parênquima paliçádico e por três a quatro camadas de parênquima esponjoso. As células do parênquima paliçádico são alongadas e dispostas em forma de barras dispostas em fileiras em seção transversal da folha, enquanto que as células do tecido esponjoso variam na forma, mas na sua maioria são isodiamétricas e os espaços intercelulares podem ter amplitudes variadas (Menezes *et al.*, 2003). Entretanto, pode-se notar que na 'Santa Clara', o arranjo das células é mais compacto (Figura 3A) do que em *L. hirsutum* (Figura 3C).

A folha contém um feixe vascular principal distribuído em nervuras por toda a folha. O sistema vascular é formado pelo xilema e floema. O xilema é localizado no centro da nervura, enquanto o floema é distribuído tanto do lado abaxial quanto adaxial do feixe (feixes bicolaterias) (TAH, 2005), tanto na cultivar de *L. esculentum* quanto no acesso de *L. hirsutum* (Figura 4A e 4B, respectivamente). Apesar do vírus utilizar o floema para se movimentar a longa distância na planta, causando infecção sistêmica, (Lucas, 2006) a infecção pelo PepYMV não causou nenhuma alteração no sistema vascular das plantas suscetíveis.

Num estudo do movimento do potyvirus PepMoV em *Capsicum*, Andrianifahanana *et al.* (1997) também não observaram danos ao sistema vascular das plantas infectadas, apenas o núcleo de algumas células companheiras e elemento do tubo crivado do floema interno estavam com um tamanho maior do que o normal.

Ding *et al.* (1998) observaram que não há replicação viral nas nervuras de folhas de *C. annuum* e *L. esculentum* infectadas com TMV ou PVY, mostrando que os vírus apenas são translocados via floema, sem causar danos as suas estruturas.

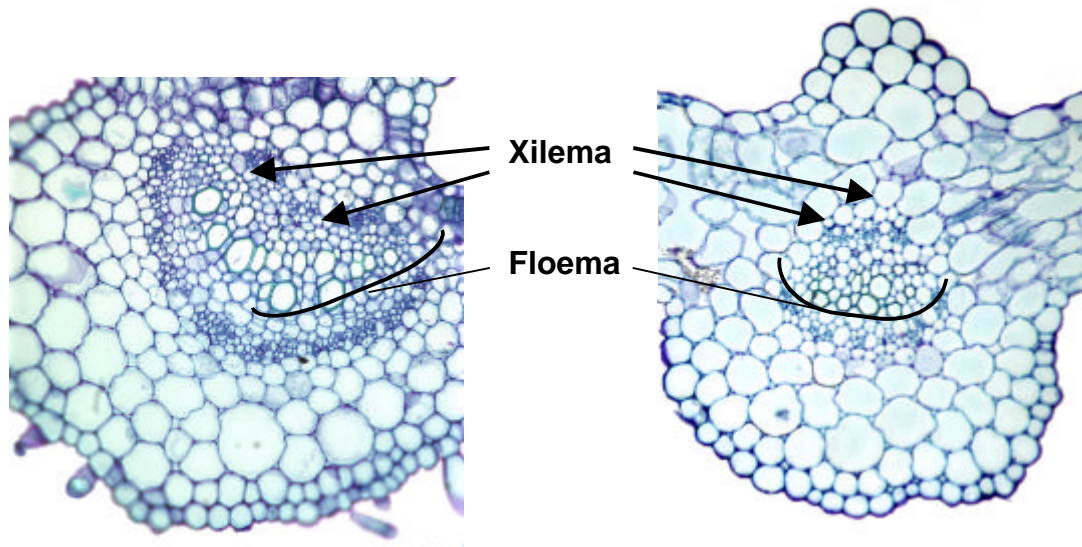


Figura 4. Sistema vascular da nervura central de folhas de tomateiro. A- controle da cultivar suscetível Santa Clara. B- controle do acesso resistente 'BGH 6902'

Nas folhas com mosaico da cultivar suscetível (Santa Clara) inoculadas com o PepYMV, verificou-se anatomicamente necrose do parênquima paliçádico, que culminou com o rompimento da epiderme e ainda afrouxamento do parênquima lacunoso, ocorrendo desarranjo celular, principalmente no parênquima paliçádico, em que não houve mais a diferenciação das células no formato de "barras" (Figura 3B). Observou-se também um aumento no número e redução do tamanho das células do parênquima lacunoso quando comparado ao controle. A folha ficou mais espessa, talvez devido a uma hipoplasia das células, nas áreas de mosaico,

assim como comentado por Hull (2002). Estes sintomas não foram visualizados nas plantas controle (Figura 3A).

No acesso resistente (BGH 6902), assintomático, a estrutura anatômica da planta foi preservada, não havendo diferenças entre o tecido inoculado (Figura 3D) e o não inoculado (Figura 3C).

No híbrido F₁ obtido a partir do cruzamento 'Santa Clara' x BGH 6902, apesar de visualmente terem sido detectados sintomas pouco evidentes (Figura 2C), não houve alterações na estrutura dos tecidos foliares (Figura 3E).

Houve alterações anatômicas nos tecidos foliares das plantas F₂ suscetíveis. O parênquima paliçádico foi o tecido mais afetado (Figura 3F), ocorrendo desarranjo celular, principalmente no parênquima paliçádico, em que não houve mais a diferenciação das células no formato de "barras", o que culminou com uma desuniformidade na espessura do mesofilo. Nas regiões entre as nervuras, o parênquima paliçádico não estava arranjado em células colunares e com uma estrutura compacta, como observado em tecidos saudáveis, formando uma depressão epidérmica nesta região. Desta forma a superfície ficou com aspecto ondulado (Figura 3H) quando comparado ao controle de 'Santa Clara' (Figura 3G). O mesmo foi relatado por Hull (2002), quando cita que folhas de plantas com sintomas de mosaico frequentemente mostram hipoplasia nas áreas amareladas, e a lâmina foliar nessas áreas fica mais fina do que nas áreas verde escuras

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o vírus causou sérios danos as folhas infectadas das plantas suscetíveis, tanto morfológica quanto anatomicamente, indicando a severidade da doença. Para investigar com mais detalhes as estruturas da folha que foram danificadas, sugere-se estudos detalhados da infecção viral, utilizando microscopia eletrônica de transmissão para comparar genótipos resistentes e suscetíveis ao PepYMV.

5. BIBLIOGRAFIA

- ANDRIANIFAHANANA, M.; LOVINS, K.; DUTE, R.; SIKORA, E. MURPHY, J. F. Pathway for Phloem-Dependent Movement of Pepper Mottle Potyvirus in the Stem of *Capsicum annuum*. **Phytopatology**, v. 87, n. 9, p.892-899, 1997.
- ALVARENGA, M.A.R. Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, MG, 2004. p. 15-30.
- ÁVILA, A.C.; IONUE-NAGATA, A.K.; COSTA, H.; BOITEUX, L.S.; NEVES, L.O.Q.; PRATES, R.S.; BERTINI, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.3, p.655-658, 2004.
- BERGER, P.H., ADAMS, M.J., BARNETT, O.W., BRUNT, A.A., HAMMOND, J., HILL, J.H., JORDAN, R.L., KASHIWAZAKI, S., RYBICKI, E.P., SPENCE, N., STENGER, D.C., OHKI, S.T., UYEDA, I., VAN ZAAYEN, A., VALKONEN, J.P. & VETTEN, H.J. Family Potyviridae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.819-841.
- DING, X.S.; CARTER, S. A.; DEOM, C. M.; NELSON, R. S. Tobamovirus and Potyvirus Accumulation in Minor Veins Inoculated Leaves from Representatives of the *Solanaceae* and *Fabaceae*. **Plant Physiology**, v.116, p.125–136, 1998.
- GILARDÓN, E.; POCOVI, M.; HERNÁNDEZ, C. OLSEN, A. Papel dos tricomas glandulares da folha do tomateiro na oviposição de *Tuta absoluta*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 585-588, mar. 2001.
- HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. Fourth Edition, Academic Press, 2002. 1001p.
- HINRICHS-BERGER, J.; BERGER, M.H.; BUCHENAUER, H. Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, n.3, p.143-150, 1999.
- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. McGraw- Hill, New York: 1940. 523p.

- LEITE, G. L. D.; PICANÇO, M.; AZEVEDO, A. A.; GONRING, A. H. R. Efeito de tricomas, aleloquímicos e nutrientes na resistência de *Lycopersicon hirsutum* à traça-do-tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.11, p.2059-2064, nov. 1999.
- LUCAS, W.J. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. **Virology**, v. 344, p. 169-184, 2006.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E.; CAPUCHO, H.C.A.S.; ÁVILA, A.C.; IONUE-NAGATA, A.K.; KITAJIMA, E.W. Surto Epidemiológico do Vírus do Mosaico Amarelo do Pimentão em Tomateiro na Região Serrana do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n.3, p.325-327, 2004.
- MENEZES, N.L.; SILVA, D.C.; PINNA, G.F.A.M. Folha. In: APPEZATO-DAGLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. p. 303-325.
- O'BRIEN, T. P. & MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty. Ltda, Melbourne – Austrália. 1981. 45p.
- TAH. Tomato Anatomy Home. Disponível em: <<http://sanangelo.tamu.edu/agronomy/tomato/>> Acesso em 20 dez. 2005.
- TRUTA, A.A.C.; SOUZA, A.R.R.; NASCIMENTO, A.V.S.; PEREIRA, R.C.; PINTO, C.M.F.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Identidade e propriedades de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.160-168, 2004.
- ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A Família Potyviridae - Parte I. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.1-66, 1999.