



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**O patossistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomateiro  
no Brasil: Variabilidade de genes efetores, marcadores  
moleculares e estabilidade do gene de resistência *I-7***

**CLEBERLY EVANGELISTA DOS SANTOS**

**Brasília–DF 2023**

**CLEBERLY EVANGELISTA DOS SANTOS**

**O patossistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomateiro  
no Brasil: Variabilidade de genes efetores, marcadores  
moleculares e estabilidade do gene de resistência *I-7***

Dissertação apresentada à Universidade de  
Brasília como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa  
de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Orientador**

Dr. Leonardo Silva Boiteux

**BRASÍLIA  
DISTRITO FEDERAL – BRASIL**

**2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luciana Evangelista Pessoa dos Santos e Joaquim Pereira dos Santos, por tanto amor, incentivo e suporte incondicional!

À família e amigos por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq)/EMBRAPA Hortaliças pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela infraestrutura e materiais de pesquisa disponibilizados

Aos colaboradores do Laboratório de Fitopatologia: Luana Silva, Fabiana Ribeiro e Wagner Ribeiro, pela colaboração técnica, ensinamentos na execução de atividades no laboratório e amizade.

Aos colaboradores de irrigação de campo: Pedro, Claudemir Bertoldo e Ronan Espindola, pelos ensinamentos e pela ajuda nos experimentos.

Aos Drs. Ailton Reis e ao Leonardo Silva Boiteux, pela orientação, ensinamentos e dedicação para realização deste trabalho.

Aos amigos: Tiago Torres, David Perdomo, Rafaela Alves e Alzira Neta pela amizade e companhia.

À Daiane Sousa Peres pela companhia, carinho e motivação

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Dr. Leonardo Silva Boiteux e do Dr. Ailton Reis com apoio institucional e infraestrutura da Embrapa Hortaliças e apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

O patossistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomateiro no Brasil: Variabilidade de genes efetores, marcadores moleculares e estabilidade do gene de resistência *I-7*

**CLEBERLY EVANGELISTA DOS SANTOS**

DISSERTAÇÃO APROVADA em 31 / 08 / 2023 por:

---

Prof. Dr. Milton Luiz da Paz Lima (Examinador Externo)

---

Prof. Dr. José Ricardo Peixoto (Examinador Interno)

---

Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux (Presidente)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cléia dos Santos Cabral (Suplente Externa)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rita de Cássia Pereira-Carvalho (Suplente Interna)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL

**2023**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>144</b>
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	<b>155</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>156</b>
<b>OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO</b> .....	<b>19</b>
Objetivo geral .....	19
Objetivos específicos.....	19
<b>CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
A murcha de <i>Fusarium</i> do tomateiro .....	20
Agente Causal - <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	21
Uso de marcadores genéticos na detecção de raças de FOL e genes de resistência no tomateiro .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 2. Caracterização de isolados brasileiros de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (FOL) empregando marcadores moleculares derivados dos genes efetores <i>Six</i> (<i>secreted into the xylem</i>)</b> .....	<b>30</b>
Resumo .....	31
Abstract .....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	355
Análise molecular, origem e preservação dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	355
Caracterização molecular de raças de isolados de FOL via PCR com sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006).....	355
Fenotipagem molecular das raças de FOL via PCR com sistema de marcadores de SIX .....	366

<b>Resultados .....</b>	<b>366</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>377</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>399</b>
<b>Referências.....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO 3. Avaliação da estabilidade fenotípica e do efeito de dosagem do gene <i>I-7</i> contra uma coleção de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3 .....</b>	<b>521</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>522</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>533</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>544</b>
<b>Material &amp; Métodos .....</b>	<b>566</b>
Origem dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	566
Preparo das mudas de tomates e inoculação .....	566
<b>Resultados .....</b>	<b>57</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>611</b>
<b>Referências.....</b>	<b>622</b>
<b>CAPÍTULO 4. Desenvolvimento e validação de marcadores moleculares funcionais para monitorar a incorporação do gene <i>I-7</i> em acessos de tomateiro.....</b>	<b>722</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>733</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>74</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>755</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>777</b>
Obtenção de uma população segregante para o locus <i>I-7</i> .....	777
Preparo das mudas de tomates e inoculação .....	778
Análise de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e desenvolvimento de marcadores do tipo CAPS para o alelo <i>I-7</i> .....	778

Extração do DNA genômico das plantas inoculadas e análise de PCR utilizando marcador CAPS projetados .....	79
<b>Resultados .....</b>	<b>79</b>
Avaliação da população F <sub>2</sub> segregante para o gene <i>I-7</i> com isolados de FOL raça 3.....	79
Validação do marcador molecular do tipo CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) para monitoramento dos loci de resistência .....	80
<b>Discussão .....</b>	<b>80</b>
Avaliação da população F <sub>2</sub> segregante para o gene <i>I-7</i> contra isolados de FOL raça 3 .....	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	
<b>Conclusões.....</b>	<b>83</b>
<b>Referências .....</b>	<b>84</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>94</b>

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2. Caracterização de isolados brasileiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) empregando marcadores moleculares derivados dos genes efetores *Six* (*secreted into the xylem*)**

**Tabela 1:** Conjunto de pares de primers específicos para identificação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizados no presente trabalho visando a caracterização de isolados do Brasil..... 47

**Tabela 2:** Determinação de raças fisiológicas em um subgrupo de **107 isolados** de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* coletados no Brasil e previamente identificados como pertencentes às raças 1, 2 e 3 de acordo com bioensaios de inoculação de acessos diferenciais. Análises conduzidas com base na reação de acessos diferenciais de *Solanum (Lycopersicon)* por Gonçalves et al. (2021) e pelos padrões de amplicons obtidos com os primers *Six4* (Lievens et al. 2009) e os primers Uni, Sp13 e Sp23 (Hirano & Arie, 2006 = H&A). Amplicons monomórficos foram observados para todos os isolados quando analisados com os primers *Six1*, *Six2*, *Six3*, *Six5*, *Six6* e *Six7*, com amplicons de 1500, 1050, 750, 850, 1050 e 1250 pares de bases (pb), respectivamente. Os isolados Fus-099, Fus-100 e Fus-102 são isolados padrões internacionais para raça 1. Os quatro isolados assinalados em campo laranja mostraram incongruências entre os resultados dos bioensaios e os padrões moleculares e foram classificados como raça ainda indefinida (RI) ..... 48

### **CAPÍTULO 3. Avaliação da estabilidade fenotípica e do efeito de dosagem do gene *I-7* contra uma coleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3**

**Tabela 1:** Descrição dos 27 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 utilizados nos testes de patogenicidade contra um conjunto de acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), ‘Floradade’ (*I-2/I-2; i-3 /i-3; i-7/i-7*), ‘BHRS-2,3’ (*I-2/I-2; i-3 /i-3; I-7/I-7*) e o híbrido comercial ‘BRS Imigrante F1’ (*I-2/I-2; i-3 /i-3; I-7/i-7*)..... 69

**Tabela 2:** Avaliação dos acessos ‘Floradade’, ‘BHRS-2,3’ e o híbrido comercial ‘BRS Imigrante’ submetidos a inoculação de vinte e sete isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3, oriundos de nove regiões produtoras de tomate brasileiras. Analisados estatisticamente através de teste estatístico Tukey a nível de significância de 5%. ..... 75

### **CAPÍTULO 4. Desenvolvimento e validação de marcadores moleculares funcionais para monitorar a incorporação do gene *I-7* em acessos de tomateiro**

**Tabela 1:** Avaliação da população F<sub>2</sub> segregante para o gene *I-7* contra diferentes isolados *Fusarium*



<i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3, coletados em seis estados produtores .....	90
<b>Tabela 2:</b> Transcrição da análise do estado alélico do gene <i>I-7</i> de acordo com o resultado exibido no gel de agarose da <b>Figura 1</b> . Distribuição dos fragmentos de restrição do marcador CAPS em população F <sub>2</sub> segregantes para o <i>loci I-7</i> de tomateiro, inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raça 3.....	91

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2. Caracterização de isolados brasileiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) empregando marcadores moleculares derivados dos genes efetores Six (*secreted into the xylem*)

**Figura 1:** Exemplo ilustrativo dos perfis de amplicons de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) para o conjunto de pares de primers SIX1, SIX2, SIX3, SIX4, SIX5, SIX6 e SIX7 em uma amostra de quatro isolados. Para cada *primer* foi realizado um PCR separadamente, os isolados Fus 425, Fus 440, Fus 420 e Fus 421 apresentando idênticos perfis de amplicons de aproximadamente 1500, 1050, 750, 750, 1250, 850, 1050 e 1250 pares de bases (pb). A presença do amplicon para o marcador SIX4 indica a classificação destes isolados como FOL raça 1. M = Marcador 1Kb Plus..... 44

**Figura 2:** Padrões de amplicons para um subgrupo de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) utilizando um conjunto de pares de primers SIX1, SIX2, SIX3, SIX4, SIX5, SIX6 e SIX7 com amplicons de 1500, 1050, 750, 750, 1250, 850, 1050 e 1250 pares de bases (pb), respectivamente. As sete primeiras linhas correspondem a cada combinação isolado x primer. Os isolados Fus 535, Fus 536, Fus 152 e Fus 155 apresentaram perfis de amplicon semelhantes, caracterizados pela ausência de amplicons para o *primer Six4*, indicando que os isolados não pertencem a FOL raça 1. Todos esses isolados foram classificados como FOL raça 3 de acordo com os bioensaios. M = Marcador 1Kb Plus. .... 45

**Figura 3:** Géis de agarose (1,5 %) ilustrando padrões de amplicons de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) utilizando um conjunto de *primers Six4*, Uni, Sp13 e Sp23 (as quatro primeiras linhas de corrida ilustram o perfil de amplicons obtido para cada combinação isolado x primer. Isolado **Fus-099** (padrão FOL raça 1 cosmopolita; bioensaio = FOL raça 1), **Fus-100** (padrão FOL raça 1 cosmopolita; bioensaio = FOL raça 1), **Fus-022** (isolado brasileiro de Botucatu-SP FOL raça 1; bioensaio = FOL raça 1), **Fus-027** (isolado brasileiro de Botucatu-SP FOL raça 1; bioensaio = FOL raça 1), **Fus-028** (isolado brasileiro de Botucatu-SP FOL raça 2; bioensaio = FOL raça 2), **Fus-439** (isolado brasileiro de Paranapuã-SP, bioensaio = FOL raça 3), **Fus-425** (bioensaio = FOL raça 3), **Fus-440** (bioensaio = FOL raça 1), **Fus-376** (bioensaio = FOL raça 1), **Fus-314** (bioensaio = FOL raça 3), **Fus-420** (bioensaio = FOL raça 1), **Fus-421** (bioensaio = FOL raça 1). M = Marcador 1Kb Plus ..... 45

### CAPÍTULO 3. Avaliação da estabilidade fenotípica e do efeito de dosagem do gene *I-7* contra uma coleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3

**Figura 1:** Acessos de tomateiro inoculados com isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3. **Painel A:** Acesso ‘BHRS 2,3’ apresentando resistência ao FOL raça 3 devido a presença do locus *I-7* em homozigose. **Painel B:** Híbrido comercial ‘BRS Imigrante’ apresentando resistência aos isolados FOL raça devido a presença de locus *I-7* em heterozigose. **Painel C:** Cultivar ‘Floradade’ apresentando sintomas severos resultante do ataque do patógeno devido a ausência de genes de resistência contra isolados de FOL raça 3. **Painéis D, E & F:** Plantas controle correspondente a cada acesso, inoculadas com água destilada ..... 67

**Figura 2:** Reação de acessos de tomateiro ‘Floradade’ (*I-2/I-2*; *i-3 /i-3*; *i-7/i-7*); ‘BHRS-2,3’ (*I-2/I-2*; *i-3 /i-3*; *I-7/I-7*) e ‘BRS Imigrante’ (*I-2/I-2*; *i-3 /i-3*; *I-7/i-7*). Os acessos foram inoculados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 e as interações foram descritas de acordo com classes de reação planta/patógeno: resposta similar a imunidade (**SI**), notas de severidade igual a 1; altamente resistente (**AR**), notas entre 1,01 a 2,00; resistência moderada (**RM**), notas entre 2,01 a 3,00; suscetível (**SU**), notas entre 3,01 a 4,00 e altamente suscetível (**AS**), notas entre 4,01 a 5,00; ..... 68

#### **CAPÍTULO 4. Desenvolvimento e validação de marcadores moleculares funcionais para monitorar a incorporação do gene *I-7* em acessos de tomateiro**

**Figura 1:** Representação esquemática da região genômica contendo o alelo recessivo de suscetibilidade *i-7*: Cromossoma 8 iniciando no nucleotídeo 61.639.734 na montagem do genoma de referência Heinz 2.5. (Sol Genomics Network). Os “primers” representados são: R 430 Comum 5’-AAG TTG GTT AAG TTG TGC-3’; e F 430 suscetível (5’-TTA CTA TGG **CTG TGA** CAG TG-3’). O “primer” F 430 resistente (5’-GCT TAC **GAC TGT GAA** AAC-3’) não está representado na figura. Os nucleotídeos sublinhados e em negrito são comuns aos dois “primers”. A região de corte da enzima *SpeI* (**TGATCA**) é indicada. No entanto, no alelo suscetível a região tem a sequência alternativa **TGATAA** que não é clivada pela enzima *SpeI*, permanecendo o amplicon de 450 pares de base intacto ..... 87

**Figura 2:** Géis de agarose (1,5 %) ilustrando os padrões de restrição do marcador CAPS *I-7* amplificados na população F<sub>2</sub> segregante para o gene *I-7* (linhas de corrida entre 1 e 94), onde os produtos de restrição específicos são indicados por setas vermelhas. **M** = Marcador 1Kb Plus. **R** = homozigoto resistente. **S** = homozigoto suscetível. Plantas individuais heterozigotas (*I-7/i-7*) apresentam todas as três bandas (exemplo: do indivíduo 32 até o indivíduo 36). ..... 88

**Figura 2:** Géis de agarose (1,5 %) ilustrando os padrões de restrição do marcador CAPS *I-7* amplificados na população F<sub>2</sub> segregante para o gene *I-7* (linhas de corrida entre 1 e 94), onde os produtos de restrição específicos são indicados por setas vermelhas. **M** = Marcador 1Kb Plus. **R**

= homozigoto resistente. **S** = homozigoto suscetível. Plantas individuais heterozigotas (*I-7/i-7*) apresentam todas as três bandas (exemplo: do indivíduo 32 até o indivíduo 36). ..... 88

**Figura 3:** Ensaio de patogenicidade plantas em população F<sub>2</sub> de tomateiro portadoras do gene *I-7* inoculadas com FOL raça 3. (R) Plantas controle resistentes BHRS-2,3 (homozigoto). (S) Plantas controle suscetíveis Floradade (homozigoto). As fotos foram tiradas 20 dias após a inoculação. Após 18 dias as plantas foram coletadas e extraídas o DNA para análise. As plantas 27, 65, 70 e 85 apresentaram um fragmento de amplicom característicos de homozigoto suscetível. As plantas 01, 02, 28, 37, 40, 42, 47, 48, 57, 58, 66, 86 e 92 apresentaram dois padrões de fragmento de amplicom característicos de homozigoto resistente. As plantas 35, 36, 38, 39, 41, 49, 50, 69 e 91 apresentaram três padrões de fragmento de amplicom característicos de heterozigoto resistente. Os dados de avaliação dos sintomas da doença aos 21 dias foram os mesmos encontrados para os homozigotos (*I-7/I-7*) e heterozigotos (*I-7/i-7*) apresentaram perfil de resistência ao patógeno. Os homozigotos (*i-7/i-7*) foram suscetíveis ao patógeno, apresentando sintomas severos de amarelecimento e murcha. .... 89

## RESUMO GERAL

SANTOS, Cleberly Evangelista. **O patossistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomateiro no Brasil: Variabilidade de genes efetores, marcadores moleculares e estabilidade do gene de resistência I-7.** 2023. Número de páginas 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A murcha vascular, provocada por distintas raças do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), se destaca como uma das principais doenças que afetam a cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no mundo. Este grupo de fitopatógenos invade o sistema radicular de cultivares suscetíveis e coloniza os vasos do xilema, impedindo o transporte ascendente de seiva provocando o sintoma de murcha. Três raças fisiológicas de FOL já foram descritas e uma suposta raça 4 está em processo de caracterização na Califórnia. Essas raças são definidas com base na capacidade de infectar um conjunto de acessos diferenciais de tomateiro contendo quatro genes de resistência dominantes (*I*, *I-2*, *I-3* e *I-7*). O plantio de cultivares com genes de resistência contra as diferentes raças fisiológicas é a principal medida de controle adotada nas áreas de produção, uma vez que é impossível a erradicação do patógeno após infestação do solo. A determinação das raças fisiológicas de FOL também é possível por meio de marcadores moleculares desenvolvidos por Hirano & Aire (2006) que possibilitam a identificação de forma rápida e confiável. A caracterização inicial das raças fisiológicas de FOL no Brasil foram conduzidos exclusivamente com ensaios de patogenicidade. Posteriormente, estudos de caracterização molecular utilizando os marcadores de Hirano & Aire (2006) não permitiram a diferenciação dos isolados brasileiros de FOL raça 1 e FOL raça 2 que apresentam um padrão de amplicons idêntico aos dos isolados de FOL raça 1 cosmopolita. Um grupo de pequenas proteínas ricas no aminoácido cisteína (denominadas de SIX = *secreted into the xylem*) são moléculas efetoras de FOL que desempenham um papel crucial na colonização do hospedeiro e na expressão de sintomas. Um sistema de marcadores moleculares alternativo foi desenvolvido com base na utilização de *primers* derivados dos genes da série *Six*. No entanto, esse sistema de marcadores moleculares ainda não foi avaliado com os isolados brasileiros. Um conjunto representativo de 107 isolados brasileiros de FOL foi avaliado com esses *primers* e um novo marcador (*Six 4*) se mostrou útil para discriminar isolados brasileiros de FOL raça 1 e raça 2 (**Capítulo 2**). Outro objetivo do presente trabalho foi realizar a avaliação da estabilidade e do efeito de dosagem do gene *I-7* em homozigose e heterozigose contra isolados brasileiros de FOL raça 3. Os resultados indicaram que uma única cópia do gene *I-7* se mostra suficiente para evitar a expressão de sintomas de todos os isolados avaliados (**Capítulo 3**). Um novo marcador molecular foi avaliado para uso no monitoramento da incorporação do gene *I-7* em acessos de tomateiro (**Capítulo 4**). Para isso, foi obtido uma população F<sub>2</sub> segregante para o gene *I-7* que foram inoculadas com uma suspensão de esporos de FOL raça 3 e avaliadas através de uma escala de notas. O DNA das plantas suscetíveis e resistentes foi extraído e usados como molde para análise de um marcador do tipo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) presente dentro do gene *I-7* (cromossomo 8), possibilitando o desenvolvimento de um marcador funcional codominante do tipo CAPS. O emprego desse marcador molecular pode aumentar a eficiência e oferecer uma maior segurança no processo de seleção de plantas resistentes. Em resumo, o presente trabalho apresenta novas e relevantes informações sobre os patossistema FOL–tomateiro que poderão ser aplicados em estratégias de manejo genético deste grupo de patógenos.

**Palavras-chave:** controle genético, melhoramento genético, resistência genética, diversidade de fungos

## GENERAL ABSTRACT

SANTOS, Cleberly Evangelista. **The pathosystem *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomato in Brazil: Variability of effector genes, molecular markers, and stability of the *I-7* resistance gene.** 2023. Number of pages 96 p. Dissertation (Master Degree in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Vascular wilt, caused by different races of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), is as one of the main diseases that affect the tomato crop (*Solanum lycopersicum* L.) around the world. This group of pathogens invades the root system of susceptible cultivars and colonizes the xylem vessels, preventing the ascending transport of sap and causing the wilt symptom. Three physiological races of FOL have already been described and a putative race 4 is in the process of being characterized in California. These races are defined based on their ability to infect a set of differential tomato accessions containing four dominant resistance genes (*I*, *I-2*, *I-3*, and *I-7*). Planting cultivars with resistance genes against different physiological races is the main control measure adopted in production areas, since when the soil is infested, it is impossible to eradicate the pathogen. The determination of the physiological races of FOL is also possible by means of molecular markers developed by Hirano & Aire (2006) that allow a fast and reliable identification. The initial characterization of the physiological races of FOL in Brazil were conducted exclusively with pathogenicity assays. Subsequently, molecular characterization studies using the markers of Hirano & Aire (2006) did not allow the differentiation of the Brazilian FOL race 1 and FOL race 2 isolates that displayed an identical pattern of amplicons to the isolates of cosmopolitan FOL race 1. A group of small proteins rich in the amino acid cysteine, called SIX (= *secreted into the xylem*), are effector molecules of FOL that play a crucial role in host colonization and symptom expression. An alternative molecular marker system was developed based upon the use of primers derived from the genes of the series *Six*. However, this system of molecular markers has not yet been evaluated with Brazilian isolates. A representative set of 107 Brazilian FOL isolates was evaluated with these primers and a new marker (*Six 4*) proved to be useful to discriminate the Brazilian isolates of FOL race 1 and race 2 (**Chapter 2**). Another objective of the present work was to evaluate the stability as well as the dosage effect of the *I-7* gene in homozygosity and heterozygosity against Brazilian FOL race 3 isolates. The results indicated that a single copy of the *I-7* gene is sufficient to prevent the expression of symptoms against all evaluated isolates (**Chapter 3**). A new molecular marker was evaluated for use in monitoring the incorporation of the *I-7* gene into tomato accessions (**Chapter 4**). For this, an F<sub>2</sub> population segregating for the *I-7* gene was obtained and inoculated with a suspension of FOL race 3 spores and evaluated using a rating scale. The DNA of susceptible and resistant plants was extracted and used as a template for analysis of a single nucleotide polymorphism (SNP) marker present within the *I-7* gene (chromosome 8), enabling the development of a codominant functional CAPS marker. The use of this molecular marker can increase efficiency and offer greater confidence in selecting resistant plants. In summary, the present work presents new and relevant information about the FOL–tomato pathosystem that could be applied in genetic management strategies for this group of pathogens.

**Keywords:** genetic control, breeding, disease resistance, diversity of plant pathogenic fungi

---

Advisor – Leonardo Silva Boiteux

## INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta pertencente à ordem Tubiflorae, gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) da família Solanaceae, sendo uma das hortaliças mais cultivadas no mundo (Peralta et al., 2006). As espécies silvestres e domesticadas de tomateiro possuem como centro de origem a América do Sul, englobando Peru, Bolívia, Chile e Equador (incluindo as Ilhas Galápagos). O mais provável centro de domesticação e diversificação do tomateiro é o México (Maranca, 1986). O gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) é composto por um conjunto de 13 espécies sendo 12 espécies silvestres (*S. arcanum*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. corneliomulleri*, *S. galapagnese*, *S. habrochaites*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S. pennellii*, *S. peruvianum* e *S. pimpinellifolium*) que possuem uma relação direta com o tomate cultivado – *S. lycopersicum* (Peralta et al., 2006).

Existem basicamente duas cadeias de produção de tomate: uma é destinada para consumo *in natura* e a outra para a indústria de processamento. Atualmente são produzidas, em todo o mundo, 177.118.248 toneladas por ano. A China é o maior produtor, a Índia ocupa o segundo lugar e o Brasil ocupa a nona posição, com uma produção anual de 4.167.629 toneladas (FAOSTAT, 2020). O cultivo do tomateiro no Brasil teve início no final do século XVIII e, atualmente, é a segunda hortaliça de importância socioeconômica, ocupando áreas de plantio com amplas variações climáticas e topográficas (IBGE, 2019). O cultivo do tomateiro é realizado em todas as regiões e em todos os estados brasileiros, durante o ano todo, com variações de produtividade e produção de acordo com a região, estando relacionado diretamente com particularidades climáticas, precipitações pluviométricas e sistema de cultivo em campo aberto ou sistemas protegidos. Os estados que lideram as maiores produções são Goiás-GO, São Paulo-SP, Minas Gerais-MG e Bahia-BA. Estes quatro estados juntos, respondem por 72,12% da produção de tomate industrial e *in natura* no país (Dossa & Fuchs, 2017; Sousa Neto, 2019). A planta é uma espécie muito sensível a variações climáticas durante seu cultivo, sendo que a oferta de tomates se ajusta à demanda ao longo do ano. A ocorrência de problemas climáticos, doenças bióticas ou abióticas nas regiões produtoras acabam provocando grandes variações nos preços de comercialização por ser um produto com reduzido tempo de prateleira e basicamente destinado ao consumo interno. Desta forma, o aumento do seu preço estimula os produtores a aumentarem as áreas plantadas e, conseqüentemente, o aumento da oferta acaba regularizando o mercado, abaixando os preços a patamares anteriores devido o equilíbrio da oferta do produto e demanda de consumo (IBGE,

2019).

A cultura do tomateiro pode ser afetada por mais de 200 doenças provocadas por fatores bióticos e abióticos, ocasionando redução significativa de produtividade das lavouras e afetando a sanidade e qualidade do produto comercial em diferentes regiões do mundo (Reis & Lopes, 2012). Os principais problemas que afetam a cultura são as doenças bióticas que podem inviabilizar o cultivo em algumas regiões altamente infestadas pelos fitopatógenos ou limitar o cultivo em algumas épocas do ano com condições favoráveis e elevando custo de produção.

Dentre as principais doenças que afetam severamente a cultura do tomate, destaca-se a murcha de Fusarium (MF), que afeta a planta em qualquer estágio e está presente em todos os países produtores (Kurozawa & Pavan, 2005). A MF é uma doença devastadora em muitas plantas de interesse econômico como o tomateiro, algodão, feijão, ervilha, melão, grão-de-bico e banana. No entanto, os diferentes isolados patogênicos de *F. oxysporum* possuem uma alta especificidade por determinada espécie de planta hospedeira. O fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) é específico para a cultura do tomate e possui diferentes raças que são capazes de infectar determinadas variedades (Kuramae & Souza, 2008). É uma doença radicular, favorecida por solos ácidos com baixa saturação de macronutrientes catiônicos, temperaturas elevadas de 21–33 °C e solos arenosos (Pereira et al., 2014). A doença pode ser disseminada na lavoura a curtas distâncias por meio da utilização de implementos agrícolas infestados, água de irrigação, substratos infestados e mudas infectadas. A disseminação mais eficiente a longas distâncias é realizada por meio da transmissão por sementes contaminadas com o patógeno (Lopes et al., 2005). O processo infectivo de FOL envolve a germinação de esporos e ou de estruturas clamidospóricas no solo, próximo às raízes em crescimento da planta. Em contato com a superfície da raiz ocorre a fixação e penetração do fungo via o córtex da raiz e crescimento de hifas dentro do feixe vascular do xilema (Michielse & Rep, 2009).

Os sintomas iniciais provocados por FOL são observados em reboleiras ou em algumas plantas isoladas. As folhas mais velhas apresentam amarelecimento que progride para murcha do limbo foliar. Os sintomas de murcha são ocasionados pela presença do patógeno no feixe vascular comprometendo o fluxo de seiva mineral ascendente. Algumas vezes, os sintomas se manifestam em apenas um lado (hemisfério) da planta ou da folha (Gonzalez-Cendales et al., 2016). Em estádios mais avançados da doença o amarelecimento progride de forma ascendente até atingir as folhas mais novas no terço superior da planta, fazendo com que o desenvolvimento dos frutos seja comprometido e provoque o amadurecimento prematuro e queda precoce de frutos (Srinivas et al.,



2019).

Atualmente, três raças de FOL estão distribuídas mundialmente (denominadas de raças 1, 2 e 3). A identificação destas raças é realizada com base em bioensaios que avaliam a capacidade dos diferentes isolados de FOL infectarem (ou não) um conjunto distinto de acessos de *S. lycopersicum* L. e *S. pennellii* Correll, portadores de fatores (genes) de resistência do tipo raça-específicos, designados pelo símbolo *I* (= *Immunity*). Quatro genes dominantes de resistência específica às raças de FOL (*I*, *I-2*, *I-3* e *I-7*) foram caracterizados até o presente momento, sendo originalmente detectados em acessos selvagens de tomateiro *Solanum* (seção *Lycopersicon*). Todos esses genes já foram introgrididos em acessos de *S. lycopersicum* (Gonzalez-Cendales et al., 2016). Os genes *I* e *I-2* foram derivados de acessos de *S. pimpinellifolium* e apresentam resistência às raças 1 e 2 de FOL (ambos localizados no cromossomo 11), respectivamente. O gene *I* codifica uma proteína atípica semelhante ao receptor com repetição rica em leucina (*Leucine Rich Repeat* – LRR) que fica ancorada na membrana plasmática (Catanzariti et al., 2017). O gene *I-2* também exibe em sua estrutura os motivos LRR (Simons et al., 1998). O gene *I-3* (localizado no cromossomo 7) é derivado de um acesso de *S. pennellii* e confere resistência às raças 2 e 3, codifica uma quinase semelhante ao receptor S (Catanzariti et al., 2015). O gene *I-7*, por sua vez, foi introduzido de outro acesso de *S. pennellii*. O gene *I-7* está localizado no cromossomo 8 e codifica uma proteína semelhante ao receptor LRR que exibe um amplo espectro de eficiência contra isolados de todas as três raças (Gonzalez-Cendales et al., 2016). Recentemente, isolados de FOL capazes de quebrar a resistência do gene *I-7* foram detectados no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Oliveira et al., 2023).

Atualmente, as raças 1 e 2 de FOL estão disseminadas em praticamente todas as regiões produtoras de tomate no mundo, ao passo que a raça 3 está sendo disseminada rapidamente, provocando surtos epidemiológicos e ocasionando perdas de produtividade (Debbie et al., 2018; Malbrán et al., 2020; Gonçalves et al., 2021). Desta forma a identificação correta e precisa das raças de FOL em condições de campo se torna extremamente importante no posicionamento do manejo correto para a cultura (Gonçalves et al., 2021).

O uso de marcadores moleculares desenvolvidos e validados por Hirano & Aire (2006), capazes de distinguir as três raças de FOL, sendo, portanto, uma importante ferramenta de diagnose. Estes marcadores se baseiam na identificação de polimorfismos de nucleotídeos em genes que codificam enzimas que degradam a parede celular da planta hospedeira (exo-poligalacturonase e endo-poligalacturonase), possibilitando também identificar isolados de *F.*

*oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* oriundos de diferentes regiões no mundo (Hirano & Arie, 2006; Chang et al., 2018; Cabral et al., 2020; Ye et al., 2020). O uso concomitante de marcadores específicos associados aos genes efetores *Six* (*secreted into the xylem*), possibilita a distinção precisa das diferentes raças de FOL por meio da identificação dos genes codificadores deste grupo de pequenas proteínas ricas em cisteína. Essas proteínas são secretadas pelas diferentes raças de FOL no xilema da planta hospedeira e desempenham um papel crucial na colonização do hospedeiro e expressão dos sintomas, estando diretamente associadas ao perfil de virulência/avirulência das raças de FOL (Cao et al., 2018).

Neste contexto, é de suma importância a validação desses marcadores molecular na discriminação correta de diferentes isolados brasileiros, oriundos de diversas regiões produtoras de tomate no país. Para posteriormente serem utilizados em programas rotineiros de detecção de raças de FOL em laboratórios de Fitopatologia no país.

## OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

### Objetivo geral

- Avaliar a variabilidade de genes efetores de isolados de FOL, a estabilidade do gene de resistência *I-7* e a eficiência de um marcador molecular funcional para utilização em programas de melhoramento genético de tomateiro.

### Objetivos específicos

- Realizar a caracterização de isolados brasileiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) empregando marcadores moleculares associados com os genes efetores da série *Six* (*secreted into the xylem*).
- Avaliar a estabilidade e o efeito de dosagem do gene *I-7* contra isolados brasileiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- Desenvolver e validar um marcador molecular funcional para monitorar a incorporação do gene *I-7* em acessos de tomateiro.

## REVISÃO DE LITERATURA

### A murcha de *Fusarium* do tomateiro

A murcha de *Fusarium* se destaca entre as diversas doenças fúngicas que afetam a cultura do tomateiro, podendo afetar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento e estando presente em todos os países produtores (Kuramae & Souza, 2008). O agente causal é o fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) que possui uma alta especificidade hospedeira e apresenta diferentes raças que são capazes de infectar determinadas variedades de tomate (Srinivas et al., 2019). FOL é um patógeno de solo que é favorecido por solos ácidos, arenosos e com baixa saturação de macronutrientes catiônicos e por temperaturas elevadas na faixa entre 21–33 °C (Pereira et al., 2014). A dispersão do FOL na lavoura a curtas distâncias pode ocorrer por meio da utilização de implementos agrícolas infestados, água de irrigação, substratos infestados e mudas infectadas. A dispersão/transmissão mais eficiente a longas distâncias é realizada por meio de sementes contaminadas com o patógeno, mudas infectadas ou material vegetativo contaminado (Lopes et al., 2018).

O processo infectivo de FOL envolve a germinação de esporos no solo, próximo as raízes em crescimento da planta, em condições favoráveis de temperatura e umidade (UR). Em contato com a superfície radicular ocorre a fixação e penetração do fungo via o córtex e crescimento de hifas ocorre dentro do feixe vascular. Conseqüentemente, o patógeno coloniza o sistema vascular e esporula na planta interrompendo o fluxo água e nutrientes de forma ascendente (Michielse & Rep, 2009). Os sintomas provocados por este fitopatógeno na planta hospedeira podem variar de murcha e escurecimento vascular, amarelecimento foliar, podridões radiculares, necrose no caule na região do colo, redução no crescimento e tombamento em plântulas jovens podendo levar à morte (Ma et al., 2010). Os sintomas na parte aérea se manifestam inicialmente no terço inferior, nas folhas mais velhas, à medida que o fungo progride os sintomas avançam em direção aos terços médio e superior da planta (Lopes et al., 2018). Quando a hospedeira entra no estágio reprodutivo os sintomas são mais severos, ocorrendo murcha em toda parte aérea, necrose foliar e abortamento de flores e frutos. O caule, quando cortado próximo ao solo em sentido longitudinal, apresenta uma coloração marrom intensa logo abaixo da casca resultante da propagação do patógeno provocando escurecimento dos vasos de todo o caule ou apenas em um lado (morte ascendente), ocasionando o sintoma da “murcha hemisférica” que pode ocorrer em um lado da planta ou um lado da folha (Rep et al., 2004). Em condições favoráveis a doença pode ocasionar perdas de até

100% em cultivos em campo aberto.

Em relação ao manejo genético dessa doença, se faz necessário um levantamento criterioso da ocorrência do patógeno nas principais regiões produtoras de tomate no Brasil, visando a identificação das raças predominantes. O controle cultural é de difícil execução, baseando principalmente em medidas preventivas para evitar a ocorrência do patógeno na área, tendo em vista que os produtos químicos são pouco eficientes e aumentam consideravelmente o custo de produção. Neste aspecto, as medidas de controle genético (com o uso de variedades e híbridos resistentes) têm alcançado sucesso no manejo da doença. Distintos genes de resistência, específicos às diferentes raças, têm sido introduzidos em cultivares comerciais, visando proteger a cultura do tomateiro contra essa devastadora doença (Cabral et al., 2020).

#### **Agente causal – *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

As espécies e *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* compõe um importante grupo de fitopatógenos de ampla distribuição mundial, estando presentes na maioria das regiões produtoras. Esses patógenos apresentam um amplo perfil de virulência e patogenicidade, sendo reportados infectando diversas espécies vegetais. Esses patógenos são capazes de sobreviver no solo na ausência do hospedeiro por longos períodos através de estruturas de resistência, denominadas clamidósporos, que são capazes de se manter viáveis por mais de sete anos. A morfologia da colônia em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) é de crescimento pálido, porém alguns isolados podem apresentar diferentes colorações, variando de violeta, púrpura, laranja e creme. O crescimento da colônia produz micélios aéreos difusos, microconídios, macroconídios e clamidósporos (Leslie & Summerell, 2006).

Essa grande variação de características morfológicas aliada ao amplo perfil de virulência e patogenicidade resultou em uma complexa classificação, sendo utilizado os conceitos de raças e *formae speciales* dentro do gênero *Fusarium*. Snyder & Hansen (1953) aplicaram o conceito de *formae specialis* para distinguir isolados da mesma espécie com características patogênicas e saprofíticas com base na capacidade de parasitar uma gama de hospedeiros específicos através de teste de patogenicidade em várias espécies de plantas pré-determinadas.

A determinação de raças do patógeno é realizada por meio de ensaios de virulência em um conjunto de cultivares diferenciadoras ou acessos pertencentes a uma espécie botânica ou em acessos de espécies correlatas a hospedeira original que são capazes de serem distinguidos por

meio do perfil de virulência/avirulência em um conjunto de acessos com fatores de resistência e suscetibilidade (Lievens et al., 2008). Desta forma, a correta identificação dos isolados patogênicos presentes no campo, sementes e mudas é um importante passo ser alcançado no manejo das doenças causadas por estes fungos (Biju et al., 2017). Até o momento foram descritas três raças (denominadas de raças 1, 2 e 3) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen. A identificação destas raças é realizada com base na capacidade dos diferentes isolados de FOL infectarem ou não um conjunto distinto de acessos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* Correll, portadores de fatores (genes) de resistência do tipo raça-específicos, designados pelo símbolo *I* (= *Immunity*) (Catanzariti et al., 2017). Esses genes foram introgrididos no tomateiro cultivado – *S. lycopersicum* (Gonzalez-Cendales et al., 2016).

A patogenicidade deste fungo a um hospedeiro em particular ocorre através de um conjunto de proteínas efetoras secretadas dentro da planta durante o processo de colonização dos tecidos vegetais. Para a colonização ser bem-sucedida por FOL nos vasos do xilema ocorre uma secreção de enzimas e proteínas dentro do feixe vascular da planta hospedeira, no qual essas proteínas desempenham o papel de promover a colonização por meio da supressão de mecanismos de defesa da planta (Rep et al., 2004). Estudos mais aprofundados sobre a patogenicidade através de análise da seiva do xilema de plantas infectadas revelaram 33 proteínas diferentes, dentre estas 13 são presentes em plantas infectadas e sete são de origem fúngica. (Houterman et al., 2007).

Estudos do proteoma da seiva de plantas infectadas por FOL revelaram 11 proteínas de avirulência (*Avr*) presentes no xilema que foram denominadas de proteínas secretadas no xilema *SIX* ('*secreted in xylem*') que desempenham papéis fundamentais na supressão dos mecanismos de defesa da planta hospedeira. Os genes de resistência da série *I* (= *Immunity*) são capazes de bloquear essas proteínas secretadas por FOL. Como exemplo, os não alélicos *I* e *I-1* são capazes de reconhecer as proteínas *Avr1* (= *SIX4*), o gene dominante *I-2* reconhece *Avr2* (= *SIX3*), o gene *I-3* reconhece a proteína *Avr3* (= *SIX1*) (Houterman et al., 2007; González et al., 2012). Desta forma estas proteínas *SIX* secretadas por FOL podem desempenhar um papel de virulência, porém os genes *I* de resistência da planta hospedeira podem reconhecer estas proteínas secretadas por FOL e desencadear uma reação de avirulência impedindo a colonização do patógeno.

Atualmente são conhecidos quatro genes dominantes que conferem resistência específica às raças (*I*, *I-2*, *I-3* e *I-7*) oriundos de acessos selvagens de tomateiro *Solanum* (secção *Lycopersicon*) e introgrididos em variedades comerciais. Dois genes de resistência foram obtidos de acessos de

*S. pimpinellifolium* L. Os genes *I* e *I-2*, que conferem resistência às raças 1 e 2 de FOL (ambos localizados no cromossomo 11). O gene *I* codifica uma proteína atípica semelhante ao receptor com repetição rica em leucina (*Leucine Rich Repeat* – LRR) que fica ancorada na membrana plasmática (Catanzariti et al., 2017). O gene *I-2* também exibe em sua estrutura os motivos LRR (Simons et al., 1998). O gene *I-3* é derivado de *S. pennellii* e confere resistência às raças 2 e 3 (está localizado no cromossomo 7), codifica uma quinase semelhante ao receptor S (Catanzariti et al., 2015). De um acesso *S. pennellii* foi caracterizado o gene *I-7* que, por sua vez, apresenta uma resistência de amplo espectro contra todas as raças de FOL. Localizado no cromossomo 8 o gene *I-7* é responsável por codificar uma proteína semelhante ao receptor LRR e exibe uma resistência de amplo espectro contra as todas as raças de FOL (Gonzalez-Cendales et al., 2016). Recentemente, isolados de FOL capazes de quebrar a resistência do gene *I-7* foram detectados no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Oliveira et al., 2023).

De acordo com os relatos de caracterização de FOL nas regiões produtoras de tomate no mundo, as raças 1 e 2 de FOL estão disseminadas em praticamente todas as regiões produtoras de tomate, ao passo que isolados da raça 3 estão gradualmente expandindo a sua distribuição ao longo das últimas décadas, provocando surtos epidemiológicos e ocasionando danos econômicos aos produtores (Debbie et al., 2018; Malbrán et al., 2020). Desta forma, a identificação correta e precisa das raças de FOL em plantas hospedeiras em condições de campo se torna extremamente importante no posicionamento do manejo genético correto para a cultura (Gonçalves et al., 2021).

**Uso de marcadores genéticos na detecção de raças de FOL e genes de resistência no tomateiro** – O uso de técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui uma importante ferramenta de identificação de polimorfismos genéticos, sendo utilizada como marcadores moleculares associados a características fenotípicas de interesse (O'Donnell et al., 2000; Singha et al., 2016). Desenvolvida em meados da década de 1980, a técnica de PCR envolve a síntese enzimática de milhões de cópias idênticas de um determinado segmento de DNA, sendo realizado este processo *in vitro* em um equipamento denominado de termociclador (White et al., 1989). O emprego de marcadores moleculares no melhoramento genético e identificação de patógenos agiliza os processos, simplifica os sistemas de seleção e diminui o tempo na obtenção dos resultados (Singha et al., 2016). Etapas importantes do melhoramento de plantas envolvendo seleção indireta, clonagem de genes e seleção de progenitores podem ser feitas através de marcadores moleculares. Esses marcadores devem, no entanto, possuir uma estreita relação com a característica desejada ou estar inserido dentro do gene que condiciona o caráter desejado, sendo

capaz de diferenciar os progenitores contrastantes de uma determinada característica e ser prontamente identificado em progênies segregantes (Vieira et al., 2006)

Os marcadores moleculares desenvolvidos e validados por Hirano & Aire (2006) são capazes de distinguir as três raças de FOL, sendo considerados uma importante ferramenta de detecção de raças deste grupo de patógenos no mundo. Estes marcadores moleculares se baseiam na identificação de polimorfismos de nucleotídeos em genes que codificam enzimas que degradam a parede celular (exo-poligalacturonase e endo-poligalacturonase) da planta hospedeira, possibilitando também identificar isolados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* oriundos de diferentes regiões do mundo (Hirano & Arie, 2006; Chang et al., 2018; Ye et al., 2020). O uso também de marcadores específicos associados aos genes efetores *Six* (= *secreted into the xylem*), possibilita a distinção de raças de FOL. Por meio da identificação de um grupo de pequenas proteínas ricas em cisteína que são secretadas pelas diferentes raças do fungo no xilema da planta hospedeira e desempenham um papel crucial na colonização do hospedeiro e expressão dos sintomas, estando diretamente associadas ao perfil de virulência/avirulência das raças de FOL (Cao et al., 2018).

Mesmo com uma grande informação de sequências e a disponibilidade diversos marcadores desenvolvidos para a identificação do patógeno, até o momento existem poucos trabalhos que abordam a caracterização de regiões gênicas que controlam a resistência ao fungo. No entanto os *primers* validados mundialmente para distinção de raças não se mostram eficientes na distinção das raças 1 e 2, devido ambos os isolados apresentarem o mesmo padrão de amplicon específico da raça 1. Neste contexto, o escopo deste trabalho tem como objetivo principal caracterizar a diversidade de isolados de FOL presentes no Brasil a nível de raça, utilizando um conjunto de marcadores moleculares da série SIX. Avaliar a estabilidade e efeito de dosagem do gene *I-7* contra isolados brasileiros. Desenvolver e validar marcadores moleculares funcionais para monitorar a incorporação do gene *I-7* em acessos de tomateiro comerciais.



## REFERÊNCIAS

- BIJU VC, FOKKENS L, HOUTERMAN PM, REP M, CORNELISSEN BJ (2017) Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology* 83(4): 1–20.
- CABRAL CS, GONÇALVES AM, FONSECA MEN, URBEN AF, COSTA H, LOURENÇO JRV, BOITEUX LS, REIS A (2020) First detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* across major tomato-producing regions in Brazil. *Phytoparasitica* 48: 545–553.
- CAO L, BLEKEMOLEN MC, TINTOR N, CORNELISSEN BJ, TAKKEN FL (2018) The *Fusarium oxysporum* *Avr2-Six5* effector pair alters plasmodesmatal exclusion selectivity to facilitate cell-to-cell movement of *Avr2*. *Molecular Plant* 11: 691–705.
- CATANZARITI AM, DO HT, BRU P, DE SAIN M, THATCHER L F, REP M, JONES DA (2017) The tomato *I* gene for *Fusarium* wilt resistance encodes an atypical leucine-rich repeat receptor-like protein whose function is nevertheless dependent on SOBIR 1 and SERK 3/BAK 1. *The Plant Journal* 89(6): 1195–1209.
- CATANZARITI AM, LIM GT, JONES DA (2015) The tomato *I-3* gene: A novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. *New Phytologist* 207:106–118.
- CHANG YD, DU B, WANG L, JI P, XIE YJ, LI XF, WANG JM (2018) A study on the pathogen species and physiological races of tomato *Fusarium* wilt in Shanxi, China. *Journal of Integrative Agriculture* 17: 1380–1390.
- DEBBIE A, BOUREGHDA H, MONTE E, HERMOSA R (2018) Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* associated with tomato diseases in Algeria and a biocontrol strategy with indigenous *Trichoderma* spp. *Frontiers in Microbiology* 9: 282.
- DOSSA D, FUCHS F (2017) Tomate: Análise técnico-econômica e os principais indicadores da produção nos mercados mundiais, brasileiro e paranaense. *Boletim Técnico 03 Tomate, Curitiba*.

FAOSTAT (2020) Banco de dados estatísticos corporativos da Food and Agriculture Organization. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso:13 de outubro, 2022.

GONÇALVES AM, CABRAL CS, REIS A, FONSECA MEN, COSTA H, RIBEIRO F H S, BOITEUX LS (2021) A three-decade survey of Brazilian *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races assessed by pathogenicity tests on differential tomato accessions and by molecular markers. *Journal of Applied Microbiology* 131(2): 873–884.

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

GONZALEZ-CENDALES Y, CATANZARITI AM, BAKER B, MCGRATH DJ, JONES DA (2016) Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology* 17: 448–463.

HIRANO Y, ARIE T (2006). PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology* 72(5): 273–283.

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

IBGE (2019). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: área, produção e rendimento médio – Confronto das safras de 2019 e das estimativas para 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamentosistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>. Acesso em: 15 outubro, 2022.

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

KUROZAWA C, PAVAN MA, KIMATI H, AMORIM L, REZENDE JMA, BERGAMIN FILHO LEA (Eds) (2005). Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). 4a Ed. Ceres, São Paulo-SP.

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

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

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

LOPES UP, MICHEREFF SJ (2018). Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. Recife: EDUFRPE, 208p.

MALBRÁN I, MOURELOS CA, AND LORI GA (2020) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing Fusarium wilt of tomato in Argentina. Plant Disease 104: 978.

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

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

O'DONNELL K, KISTLER HC, TACKE BK, CASPER HH (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97(14): 7905–7910.

OLIVEIRA CMD, CARMO MGFD, FERREIRA LM, ROCHA MDS, DINIZ CS, AMARAL-SOBRINHO NMBD (2023). Control failures of Fusarium wilt on tomatoes and resistance of

cultivars to the three races of the pathogen. *Revista Ceres* 70: 82–90.

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

PEREIRA RB, LUCAS GC, PINHEIRO JB (2014). Murcha de *Fusarium* em tomateiro. Embrapa Hortaliças-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E).

REIS A, LOPES CA (2012). Doenças causadas por fungos e distúrbios fisiológicos. Produção de tomate para processamento industrial, p.179–202, Embrapa Hortaliças, Brasília-DF.

REP M, VAN DER DOES H C, MEIJER M, VAN WIJK R, HOUTERMAN PM, DEKKER HL, CORNELISSEN BJ (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for *I-3*-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology* 53(5): 1373–1383.

SIMONS G, GROENENDIJK J, WIJBRANDI J, REIJANS M, GROENEN J, DIERGAARDE P, VAN DER LEE T, BLEEKER M (1998). Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *The Plant Cell* 10:1055–1068.

SINGHA IM, KAKOTY Y, UNNI BG, DAS J, KALITA MC (2016). Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 14(1): 99–105.

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

SOUSA-NETO, R (2019) O mercado de tomate em Goiás: estudo sobre o comportamento da cadeia e a evolução da atividade produtiva no setor *in natura*. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

SRINIVAS C, DEVI DN, MURTHY KN, MOHAN CD, LAKSHMEESHA TR, SINGH B, SRIVASTAVA RK (2019) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt

disease of tomato: Biology to diversity – a review. Saudi Journal of Biological Sciences 11: 309–314.

VIEIRA EA, NODARI RO, CARVALHO FIF, FIALHO JF (2006) Mapeamento Genético de Caracteres Quantitativos e sua Interação com o ambiente. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. Documentos, N° 170. 28pp.

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

YE Q, WANG R, RUAN M, YAO Z, CHENG Y, WAN H, LI Z, YANG Y, ZHOU, G (2020) Genetic diversity and identification of wilt and root rot pathogens of tomato in China. Plant Disease 104: 1715–1724.

## CAPÍTULO 2

**Caracterização de isolados brasileiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) empregando marcadores moleculares derivados dos genes efetores *Six* (*secreted into the xylem*)**

## Caracterização de isolados brasileiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) empregando marcadores moleculares derivados dos genes efetores *Six* (*secreted into the xylem*)

### Resumo

A murcha vascular, provocada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), pode induzir severas perdas no cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Três raças fisiológicas de FOL já foram descritas, sendo caracterizadas de acordo com diferentes padrões de interação com um conjunto de acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*) contendo quatro genes de resistência dominantes (*I*, *I-2*, *I-3* e *I-7*). A determinação de raças fisiológicas de FOL e a identificação de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* tem sido também possível por meio do uso de marcadores moleculares desenvolvidos por Hirano & Aire (2006). No entanto, estudos prévios utilizando esses marcadores moleculares mostraram que isolados brasileiros de FOL raça 2 apresentam padrões moleculares indistinguíveis dos isolados de FOL raça 1. Desta forma, utilização de diferentes marcadores moleculares se faz necessária para permitir uma diagnose mais precisa dos isolados brasileiros de FOL raça 2. Um grupo de proteínas, denominadas de *Six* (*secreted into the xylem*), são efetores de FOL que desempenham um papel crucial na colonização da planta pelo fungo e na expressão de sintomas. Um subconjunto destes genes *Six* apresenta uma forte correlação funcional com o perfil de virulência das raças de FOL. No entanto, sistemas de marcadores moleculares derivados da série gênica *Six* ainda não foram avaliados com os isolados brasileiros. O objetivo do presente trabalho foi conduzir uma fenotipagem molecular de um conjunto de 107 isolados de FOL empregando marcadores derivados dos genes efetores da série *Six* (a saber: *Six1*, *Six2*, *Six3*, *Six4*, *Six5*, *Six6* e *Six7*) em combinação com os marcadores moleculares de Hirano & Aire (2006), visando estabelecer uma correlação consistente e robusta com o perfil de virulência/avirulência de isolados brasileiros de FOL. Um conjunto de quatro pares de *primers* (*SIX4*, *Uni*, *Sp13* e *Sp23*) entre dez avaliados, se mostrou informativo e eficiente para distinguir os isolados brasileiros de FOL. O emprego conjunto destes *primers* representa uma nova e importante ferramenta molecular para a identificação e diagnose de raças e *formae speciales* de *Fusarium* que afetam o tomateiro nas condições brasileiras.

**Palavras chaves:** diversidade, perfil de virulência, murcha vascular, tomateiro, *Solanum lycopersicum*.

## Abstract

### **Characterization of Brazilian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) using molecular markers derived from the *Six* (secreted into the xylem) effector genes.**

Vascular wilt, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), can induce severe yield losses in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Three physiological races of FOL have already been described according to different patterns of interaction of isolates with a set of *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions containing four dominant resistance genes (*I*, *I-2*, *I-3*, and *I-7*). The determination of FOL physiological races and the identification of *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates is also possible using molecular markers developed by Hirano & Aire (2006). However, previous studies using these molecular markers have shown that Brazilian FOL race 2 isolates have molecular patterns that are indistinguishable from FOL race 1 isolates. Therefore, different molecular markers are needed to allow a more accurate diagnosis of Brazilian FOL race 2 isolates. A group of proteins, called SIX (= secreted into the xylem), are FOL effectors that play crucial roles in the plant colonization and symptom expression by the fungus. A subset of *Six* genes has shown a strong functional correlation with the virulence profile of the FOL races. However, *Six*-based molecular marker systems have not yet been properly evaluated with Brazilian isolates. Thus, the objective of present work was to carry out a molecular phenotyping of 107 FOL isolates using markers derived from effector genes of the series *Six* (viz. *Six1*, *Six2*, *Six3*, *Six4*, *Six5*, *Six6*, and *Six7*) in combination with the molecular markers of Hirano & Aire (2006), aiming to establish a consistent and robust correlation with the virulence/avirulence profile of FOL isolates from Brazil. Four (SIX4, Uni, Sp13, and Sp23) out of the ten pairs of primers evaluated herein were informative and efficient in distinguishing Brazilian FOL isolates. The combined use of these primers represents a new and important molecular tool for the identification and diagnosis of races and *formae speciales* of *Fusarium* that affect tomato under Brazilian conditions.

**Keywords:** diversity, virulence profile, vascular wilt, tomato, *Solanum lycopersicum*.



## INTRODUÇÃO

Os fungos componentes do complexo *Fusarium oxysporum* estão entre os fitopatógenos mais cosmopolitas, sendo agentes causais de podridões de raízes, cloroses foliares e murchas vasculares em diferentes espécies hospedeiras (Ma et al., 2010). Estes fungos podem persistir no solo por muitos anos mesmo na ausência das plantas hospedeiras originais (Ma et al., 2010; Biju et al., 2017). O complexo *F. oxysporum* também apresenta uma elevada especialização patogênica, com diferentes isolados sendo capazes de infectar um número restrito de espécies botânicas (Ma et al., 2010). Os membros do complexo *F. oxysporum* formam um dos grupos fúngicos mais diversos em termos genéticos, apresentando um amplo perfil de virulência e patogenicidade (Biju et al., 2017).

A murcha de Fusarium do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é causada, predominantemente, por três raças fisiológicas do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen (FOL), sendo uma das principais doenças que afetam a cultura em escala global. No entanto, levantamentos recentes na Califórnia têm indicado a presença de uma potencial raça 4 que consegue “quebrar” a resistência do gene *I-3* (Swett et al., 2023). Mais recentemente, isolados capazes de infectar cultivares de tomateiro contendo o gene *I-7* foram identificadas no Brasil e podem também representar uma potencial nova raça (Oliveira et al., 2023). As perdas em cultivos em campo aberto induzidos por FOL podem ultrapassar 60% em cultivares suscetíveis expostas a condições de temperatura e umidade favoráveis ao patógeno (Ravindra et al. 2015).

A infecção ocorre através de ferimentos ou aberturas naturais no sistema radicular que favorecem a penetração e colonização do tecido, provocando sintomas reflexos de amarelecimento foliar basal, que podem ser seguidos de murcha e morte da planta (Kuramae & Souza, 2008). Após a infecção por FOL, os vasos do xilema são colonizados e um conjunto de proteínas são secretadas pelo fungo (Rep et al., 2004). Essas proteínas apresentam múltiplas funções no processo de patogênese, promovendo a propagação do fungo e agindo na supressão de mecanismos de defesa da planta hospedeira (Rep et al., 2004). O perfil de virulência de uma variante do patógeno é determinado por um conjunto específico de proteínas efetoras secretadas dentro da planta durante o processo de colonização. De fato, a expressão dos genes de virulência/avirulência ocorre exclusivamente na presença de tecido vivo na planta hospedeira (Ma et al., 2013). Estudos de proteoma da seiva do xilema de plantas infectadas revelaram 33 proteínas diferentes. Dentre estas, 13 estão presentes exclusivamente nas plantas infectadas, sendo que sete delas apresentam origem fúngica (Houterman et al., 2007). Análises genômicas de isolados de

FOL revelam regiões ricas em transposons, correspondendo a quatro cromossomos (ou seja, cerca de 1/4 do genoma total). Essas regiões apresentam taxas de evolução gênica maiores, estando diretamente relacionadas com diferentes padrões de virulência e patogenicidade (Ma et al., 2010).

A identificação de isolados de *F. oxysporum* é dificultada devido a sua natureza polifilética, apresentando distintas *formae speciales* (Lievens et al., 2008). Atualmente o uso de abordagens moleculares envolvendo o sequenciamento de regiões genômicas conservadas e o uso de PCR com primers específicos representam importantes ferramentas de identificação de espécies e variantes patogênicas dentro do gênero *Fusarium* (Baayen et al., 2000; O'Donnell et al., 2000; Singha et al., 2016). O uso de ferramentas moleculares também tem sido empregado para diagnose de variantes infra-específicas, incluindo raças fisiológicas (Hirano & Aire, 2006). Estudos visando a identificação molecular de raças de FOL em tomateiro têm revelado importantes genes associados com o padrão de patogenicidade, envolvendo etapas fundamentais de infecção e colonização. Esta diversidade gênica pode ocorrer aleatoriamente no genoma ou formar aglomerados (*clusters*) gênicos em regiões telômero-proximais ou mesmo espalhadas por todo um cromossomo do tipo linhagem-específico (Rep & Kistler, 2010). Estas proteínas derivadas de FOL e presentes no xilema têm sido coletivamente denominadas como “proteínas secretadas no xilema” (*SIX* = ‘secreted into the xylem’). O cromossomo 14 ( $\approx 2.0$  Mb) de FOL apresenta um conjunto de genes relacionados a patogenicidade e fatores de virulência/efetores da série *Six* (Inami et al., 2014). No tomateiro, genes da série *I* (= *Immunity*) são capazes de bloquear a ação de um subgrupo dessas proteínas *SIX* (Lievens et al., 2009). Por exemplo, o gene *I* detecta o fator de avirulência *Avr1* (= codificador da proteína *SIX4*); gene *I-2* detecta o fator *Avr2* (= *SIX3*) e o gene *I-3* detecta o fator *Avr3* (= *SIX1*).

A determinação de raças fisiológicas de FOL tem sido conduzida atualmente no Brasil utilizando inoculações controladas em um conjunto de acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*) contendo quatro distintos genes de resistência dominantes (*I*, *I-2*, *I-3* e *I-7*) em combinação com os marcadores moleculares desenvolvidos por Hirano & Aire (2006). Esses marcadores também possibilitam a identificação de forma rápida e confiável de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Reis & Boiteux, 2007; Cabral et al., 2020; Gonçalves et al., 2021). No entanto, estudos prévios combinando bioensaios e o conjunto de marcadores moleculares Hirano & Aire (2006) mostraram que isolados brasileiros de FOL raça 2 apresentam padrões moleculares indistinguíveis dos isolados de FOL raça 1 cosmopolita (Gonçalves et al., 2021).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi conduzir uma fenotipagem com

marcadores moleculares associados com os genes efetores *Six* (*Six1*, *Six2*, *Six3*, *Six4*, *Six5*, *Six6* e *Six7*) empregando um conjunto de 107 isolados de FOL em combinação com os marcadores moleculares de Hirano & Aire (2006). Essa ação de pesquisa visa estabelecer uma plataforma de diagnose que apresente uma correlação consistente e robusta entre marcadores moleculares e o perfil de virulência/avirulência dos isolados brasileiros de FOL.

## MATERIAL & MÉTODOS

**Análise molecular, origem e preservação dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*** – Um conjunto de dez *primers* e um total de 107 isolados de FOL foram utilizados no presente estudo (**Tabelas 1, 2 & 3**). Os isolados compõem uma parte coleção de fungos fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA). Estes isolados foram obtidos de plantas sintomáticas de tomateiro em diferentes regiões produtoras de nove Estados brasileiros (**Tabela 2**). Isolados de FOL originários dos Estados Unidos, Tanzânia e Nova Zelândia também foram utilizados como padrões nos ensaios moleculares (**Tabela 2**). Os fungos foram preservados em tubos de micro centrifuga empregando o método Castellani (1963) sob temperatura de 10 °C em câmara fria. A recuperação dos isolados foi feita através da transferência do material fúngico para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) + Tetraciclina (50 µg/mL). As placas foram posteriormente vedadas com filme plástico, incubadas em temperatura ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) por sete dias em condições de fotoperíodo de 12 horas de luz. Os isolados foram inicialmente identificados a nível de espécie de acordo com um conjunto de características culturais e morfológicas (Nelson et al., 1983; Leslie & Summerell, 2006). A extração do DNA genômico dos isolados fúngicos foi realizada através do método CTAB + solventes orgânicos com modificações (Boiteux et al., 1999). Após a extração, a qualidade e quantidade do DNA foi estimada através da visualização em gel de agarose 1,5 %.

**Caracterização molecular de raças de isolados de FOL via PCR com sistema de marcadores de Hirano & Arie (2006)** – A caracterização e diferenciação molecular de raças de FOL foram realizadas via PCR, utilizando um conjunto de dez *primers* (Hirano & Arie, 2006; van der Does et al., 2008; Lievens et al., 2009) específicos (**Tabela 2**). Os componentes dos ensaios de PCR foram 5 µL de DNA genômico (20 ng/µL), 1,25 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 µL de *Taq* DNA

polimerase (5U/ l), 1 µL de cada primer, 5,95 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q com volume total de 15,5 µL. Para os conjuntos de *primers* Uni, Sp13 e Sp23 (Hirano & Arie, 2006), o programa dos ensaios via PCR consistiu de um ciclo inicial de 94 °C por 1 minuto, seguido de: 50 ciclos de 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 62 °C por 1 minuto para anelamento, 72 °C por 2 minutos de alongação e um ciclo final a 68 °C por 7 minutos. As amostras foram armazenadas a 4 °C. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose (1,5 %), adicionado 5 µL dos produtos de PCR e corados com 5 µL de um mix de GelRed (BlueJuice Gel Loading Buffer<sup>®</sup>, 5 µL marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder) e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador.

**Fenotipagem molecular das raças de FOL via PCR com sistema de marcadores de SIX** – As reações de PCR para os *primers* SIX1, SIX2 e SIX3 foram conduzidas com 2 µL de DNA total (20 ng/ µL), 1,25 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase, 1 µL de cada primer, 8,95 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q com volume total de 15,5 µL. Foi utilizado o termociclador T100 Thermal Cycler<sup>®</sup> com o programa de amplificação dos fragmentos de DNA gnômico apresentado um ciclo inicial de 94 °C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos para desnaturação, 64 °C (para os *primers* SIX1), 60 °C (para os *primers* SIX2) e 59 °C (para os *primers* SIX3) por 45 segundos para anelamento, 72 °C por 45 segundos de extensão, e ciclo final a 72 °C por 10 minutos. Para os *primers* SIX4, SIX5, SIX6 e SIX7 foi modificado apenas a quantidade de DNA genômico (5 µL) por reação. O programa utilizado para amplificação dos fragmentos consistiu em um ciclo inicial de 94 °C por 2 minutos seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos para desnaturação, 60 °C por 45 segundos para anelamento, 72 °C por 45 segundos para alongação, ciclo final a 72 °C por 10 minutos e armazenamento a 4 °C. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose (1,5%), adicionado 5 µL dos produtos de PCR e corados com 2 µL GelRed<sup>®</sup> (diluído 0,2 % em H<sub>2</sub>O Milli-Q) + 3 µL 10X BlueJuice Gel Loading Buffer<sup>®</sup>. Um volume de 5 µL marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder foi adicionado em uma linha de corrida por gel e os amplicons foram visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador para gel de eletroforese (modelo L-PIX TOUCH<sup>®</sup>).

## RESULTADOS

Os DNAs genômicos extraídos dos isolados de FOL foram inicialmente submetidos a uma fenotipagem via PCR com os marcadores moleculares de Hirano & Arie (2006). Posteriormente,

os isolados foram avaliados utilizando sete pares de *primers* da série gênica SIX. Esse conjunto de *primers* revelou diferentes tamanhos de amplicons quando visualizados em gel de agarose a 1,5%. Os padrões de amplicons de isolados de FOL para o conjunto de *primers* SIX1, SIX2, SIX3, SIX4, SIX5, SIX6 e SIX7 variaram de 750 a 1500 pares (**Figuras 1 & 2**). Os pares de *primers* SIX1, SIX2, SIX3, SIX5, SIX6 e SIX7 produziram amplicons monomórficos para todos os 107 isolados avaliados (**Tabela 2**). O par de *primers* SIX4 (que discrimina isolados de FOL raça 1 cosmopolita) foi o único capaz de gerar polimorfismos (presença versus ausência) para um amplicon de 1250 pares de base. A presença deste amplicon para o marcador SIX4, indicou que todos os isolados com a presença desta banda pertencem a FOL raça 1. Ao todo, dez isolados apresentaram perfis diferenciados para o primer SIX 4 (**Figura 2; Tabela 2**).

Todos os isolados foram subsequentemente avaliados com o primer SIX4 em combinação com os primers Uni, Sp13 e Sp23 de Hirano & Arie (2006). Essa análise conjunta permitiu separar isolados de FOL raça 1 daqueles de FOL raça 2 brasileira que não podem ser discriminados utilizando exclusivamente os marcadores de Hirano & Arie (2006). Isolados da raça 1 apresentaram o amplicon gerado pelo par de primers derivados do gene *Six4*, ao passo que os isolados de FOL raça 2 brasileira não produziram este amplicon. Os resultados confirmaram uma vez mais que os isolados de FOL raça 2 cosmopolita são diferentes dos isolados de FOL raça 2 do Brasil devido à ausência de amplificação com o primer Sp13 (Hirano & Arie, 2006). Todos os isolados de FOL raça 3 apresentaram padrões caracterizados pela ausência do amplicon produzido pelo primer derivado do gene *Six4* em associação com presença de todos os amplicons com os primers Uni, Sp13 e Sp23 de Hirano & Aire (2006). No entanto, quatro isolados ainda apresentaram resultados incongruentes entre bioensaios e padrão de amplicons para esses quatro marcadores (**Tabela 2**).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, foi conduzido uma caracterização de 107 isolados de FOL utilizando um conjunto de marcadores moleculares PCR específicos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bem como informações derivadas de bioensaios de inoculação em cultivares contendo os genes *I-1*, *I-2*, *I-3* e *I-7*. Além disso, foram utilizados teste de PCR com primers específicos gerados por Hirano & Arie (2006). Entretanto, usando estes primers, não foi possível a distinção das raças brasileiras de FOL 1 e FOL 2, de acordo com Gonçalves et al. (2021).

Em busca de um refinamento dessa plataforma de diagnose de raças brasileiras de FOL, o presente estudo avaliou um conjunto representativo de 107 isolados utilizando o conjunto de primers SIX1, SIX2, SIX3, SIX4, SIX5, SIX6 e SIX7. Nem todos os primers geraram polimorfismos nessa coleção de isolados, apesar das proteínas SIX produzidas por FOL codificarem para diferentes genes de avirulência: SIX4 por *Avr1*; SIX3 por *Avr2*; SIX1 por *Avr3* (Houterman et al., 2008; Houterman et al., 2009), que por sua vez, são reconhecidas por proteínas de resistência codificadas pelos genes *I-1*, *I-2*, *I-3* e *I-7* (Gonzalez-Cendales et al., 2016; Srinivas et al., 2019). Trabalhos de caracterização de isolados de FOL no México e Espanha realizados por Boix-Ruíz et al. (2015) utilizando marcadores da série SIX revelaram resultados variáveis na identificação de raças, quando comparados com os testes de patogenicidade em cultivares diferenciadoras. No presente estudo, o marcador molecular derivado do gene *Six4* se mostrou informativo, permitindo a distinção dos isolados de FOL raça 1 que foram previamente caracterizados por teste de patogenicidade com cultivares diferenciadoras em experimentos anteriores (Reis et al., 2005; 2006; Reis & Boiteux, 2007; Gonçalves et al., 2021). De acordo com Lievens et al. (2009) o gene *Six4* tem uma correlação com isolados da raça 1 e pode ser empregado em sistema de marcadores moleculares na distinção das raças de FOL. Estudos prévios têm revelado uma dificuldade em distinguir as raças dos isolados brasileiros de FOL através de métodos moleculares com o uso de primers disponíveis na literatura (Oliveira et al., 2021). Visando a distinção de raças presentes nos isolados brasileiros, foi utilizado um uma análise conjunta envolvendo o marcador molecular SIX4, específico para a raça 1 (Lievens et al., 2009) em combinação com o conjunto de marcadores: Uni (universal para todas as raças de FOL), Sp13 (específico para a raça 1) e Sp23 (específico para raça 2) e a produção de amplicons por todos os primers em isolados de FOL raça 3 (Hirano & Arie, 2006).

A nossa análise conjunta permitiu separar os isolados de FOL raça 1 daqueles isolados brasileiros de FOL raça 2 que não puderam ser discriminados utilizando exclusivamente os marcadores de Hirano & Arie (2006). Nestes ensaios, os isolados de FOL raça 1 apresentaram o amplicon gerado pelo par de primers *Six4*, ao passo que os isolados de FOL raça 2 brasileira não produzem esse amplicon de 1250 bp. Por sua vez, os isolados de FOL raça 2 cosmopolita se diferenciam dos isolados brasileiros de FOL raça 2 devido à ausência de amplificação com o primer Sp13 (Hirano & Arie, 2006). Esses resultados reforçam a hipótese de que os isolados brasileiros de FOL raça 2 são geneticamente muito próximos de isolados de raça 1, sugerindo uma origem evolutiva comum desses isolados (Gonçalves et al., 2021). Apesar da elevada consistência e correlação entre

bioensaios e o padrão de amplicons obtidos com esses marcadores, quatro isolados brasileiros ainda apresentaram resultados incongruentes. Isto faz com que haja a necessidade de uma nova análise destes quatro isolados em termos de perfil de virulência em acessos contendo os genes *I-1*, *I-2*, *I-3* e *I-7*.

## CONCLUSÕES

- Ensaios de PCR geraram amplicons monomórficos para todos os 107 isolados de FOL, utilizando os pares de primers SIX1, SIX2, SIX3, SIX5, SIX6 e SIX7;
- Apenas a análise utilizando o primer SIX4 (específico de raça 1) foi capaz de gerar polimorfismos consistentes (presença versus ausência) nessa coleção de isolados de isolados
- Dez isolados brasileiros foram classificados como pertencentes inequivocamente a FOL raça 1, devido ao perfil de virulência e à amplificação do produto de 1250 bp associado com o par de primers *Six4*;
- A utilização combinada do par de primers *Six4* com os primers Uni, Sp13 e Sp23 de Hirano & Arie (2006) permitiu a distinção da maioria dos isolados brasileiros de FOL raça 1 e FOL raça 2;
- Desta forma, o emprego conjunto dos primers SIX4, Uni, Sp13 e Sp23 se mostrou eficaz na caracterização de raças de uma grande maioria de isolados de brasileiros de FOL, se constituindo uma importante ferramenta molecular de caracterização rotineira em laboratórios de Fitopatologia.
- Neste contexto, o presente trabalho estabelece uma plataforma de diagnose consistente e robusta, apresentando uma associação mais precisa entre marcadores moleculares e o perfil de virulência/avirulência das variantes e isolados brasileiros de FOL.

## REFERÊNCIAS

- BAAYEN RP, O'DONNELL K, BONANTS PJ, CIGELNIK E, KROON LP, ROEBROECK EJ, WAALWIJK C (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90: 891–900.
- BIJU VC, FOKKENS L, HOUTERMAN PM, REP M, CORNELISSEN BJ (2017) Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(4): e02548-16.
- BOITEUX LS, FONSECA MEN, SIMON PW (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA based genetic fingerprinting analyses in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124: 32–38.
- BOIX-RUÍZ A, GÁLVEZ-PATÓN L, DE CARA-GARCÍA M, PALMERO-LLAMAS D, CAMACHO-FERRE F, TELLO-MARQUINA JC (2015) Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*, 43: 471–483.
- CABRAL CS, GONÇALVES AM, FONSECA MEN, URBEN AF, COSTA H, LOURENCO JR, V, BOITEUX LS, REIS A (2020) First detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* across major tomato-producing regions in Brazil. *Phytoparasitica*, 48: 545–553.
- GONÇALVES AM, CABRAL CS, REIS A, FONSECA MEN, COSTA H, RIBEIRO F H S, BOITEUX LS (2021) A three-decade survey of Brazilian *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races assessed by pathogenicity tests on differential tomato accessions and by molecular markers. *Journal of Applied Microbiology*, 131: 873–884.
- GONZALEZ-CENDALES Y, CATANZARITI AM, BAKER B, MCGRATH DJ, JONES DA (2016) Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology*, 17: 448–463.
- HIRANO Y, ARIE T (2006) Diferenciação baseada em PCR de *Fusarium oxysporum* f. sp.



*lycopersici* e *radicis-lycopersici* e raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of General Plant Pathology, 72: 273–283.

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

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

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

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

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

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

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

MA LJ, VAN DER DOES HC, BORKOVICH KA, COLEMAN JJ, DABOUSSI MJ, PIETRO AD, DUFRESNE M, FREITAG M, GRABHERR M, HENRISSAT B, HOUTERMAN PM, 41

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

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

O'DONNELL K, KISTLER HC, TACKE BK, CASPER HH (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 7905–7910.

OLIVEIRA CM, CARMO MGF, FERREIRA LM, HÖFTE, M, AMARAL-SOBRINHO, NMB (2021) Race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates obtained from tomato plants in Nova Friburgo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 161(2): 273–287.

OLIVEIRA CMD, CARMO MGFD, FERREIRA LM, ROCHA MDS, DINIZ CS, AMARAL-SOBRINHO NMBD (2023). Control failures of *Fusarium* wilt on tomatoes and resistance of cultivars to the three races of the pathogen. *Revista Ceres*, 70: 82–90.

RAVINDRA S, BISWAS SK, DEVESH N, JASKARAN S, MORAJDHWAJ S, MISHRA YK (2015) Sustainable integrated approach for management of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Synder and Hansen. *Sustainable Agriculture Research*, 4: 138–147.

REIS A, BOITEUX LS (2007) Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in

commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. *Horticultura Brasileira*, 25: 451–454.

REIS A, BOITEUX LS, URBEN AF, COSTA H (2006) Estabelecimento e caracterização a nível de raça de uma coleção de isolados *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. N o 19. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. 8pp.

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

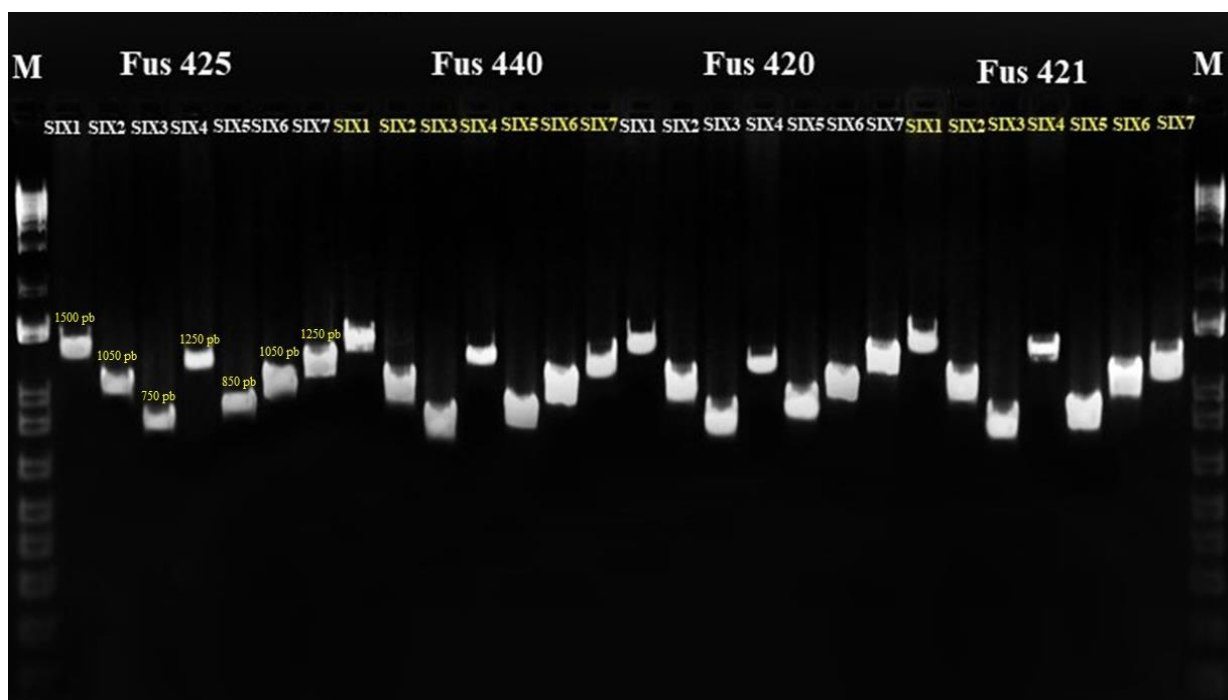
REP M, KISTLER HC (2010) The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 420–426.

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

SINGHA IM, KAKOTY Y, UNNI BG, DAS J, KALITA MC (2016) Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, Northeast India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14: 99–105.

SRINIVAS C, DEVI DN, MURTHY KN, MOHAN CD, LAKSHMEESHA TR, SINGH B, SRIVASTAVA RK (2019) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26: 1315–1324.

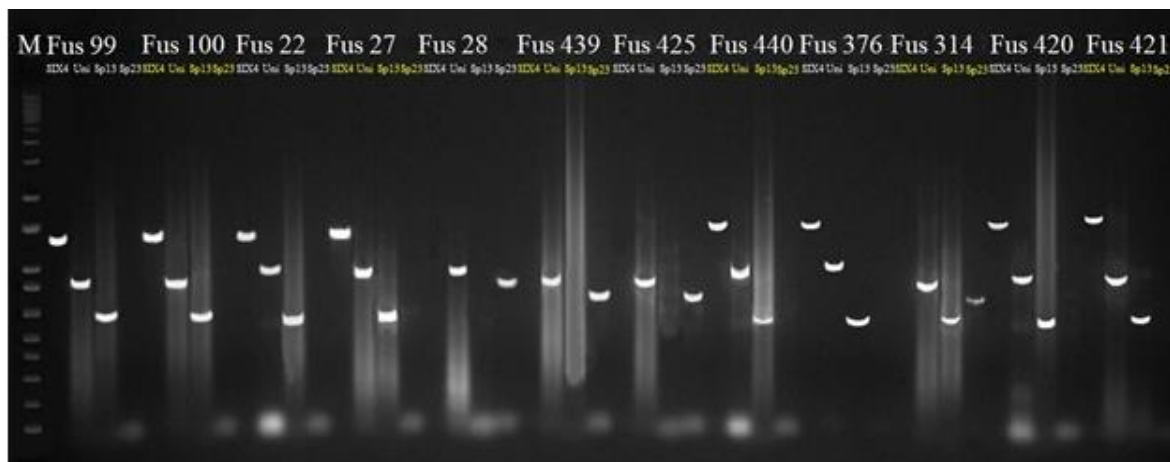
SWETT CL, DEL CASTILLO MÚNERA J, HELLMAN E, HELPIO E, GASTELUM M, LOPEZ RAYMUNDO E, JOHNSON H., OGUCHI R, HOPKINS A, BEAULIEU J, RODRIGUEZ F (2023) Monitoring for a new *I3* resistance gene-breaking race of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fusarium* wilt) in California processing tomatoes following recent widespread adoption of resistant (F3) cultivars: Challenges with race 3 and 4 differentiation methods. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1088044.



**Figura 1** – Exemplo ilustrativo dos perfis de amplicons de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) para o conjunto de pares de primers SIX1, SIX2, SIX3, SIX4, SIX5, SIX6 e SIX7 em uma amostra de quatro isolados. Para cada *primer* foi realizado um PCR separadamente, os isolados Fus 425, Fus 440, Fus 420 e Fus 421 apresentando idênticos perfis de amplicons de aproximadamente 1500, 1050, 750, 750, 1250, 850, 1050 e 1250 pares de bases (pb). A presença do amplicon para o marcador SIX4 indica a classificação destes isolados como FOL raça 1. M = Marcador 1Kb Plus.



**Figura 2** – Padrões de amplicons para um subgrupo de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) utilizando um conjunto de pares de primers SIX1, SIX2, SIX3, SIX4, SIX5, SIX6 e SIX7 com amplicons de 1500, 1050, 750, 750, 1250, 850, 1050 e 1250 pares de bases (pb), respectivamente. As sete primeiras linhas correspondem a cada combinação isolado  $\times$  primer. Os isolados Fus 535, Fus 536, Fus 152 e Fus 155 apresentaram perfis de amplicon semelhantes, caracterizados pela ausência de amplicons para o *primer Six4*, indicando que os isolados não pertencem a FOL raça 1. Todos esses isolados foram classificados como FOL raça 3 de acordo com os bioensaios. M = Marcador 1Kb Plus.



**Figura 3** – Géis de agarose (1,5 %) ilustrando padrões de amplicons de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) utilizando um conjunto de *primers* *Six4*, *Uni*, *Sp13* e *Sp23* (as quatro primeiras linhas de corrida ilustram o perfil de amplicons obtido para cada combinação isolado  $\times$  primer. Isolado **Fus-099** (padrão FOL raça 1 cosmopolita; bioensaio = FOL raça 1), **Fus-100** (padrão FOL raça 1 cosmopolita; bioensaio = FOL raça 1), **Fus-022** (isolado brasileiro de Botucatu-SP FOL raça 1; bioensaio = FOL raça 1), **Fus-027** (isolado brasileiro de Botucatu-SP FOL raça 1; bioensaio = FOL raça 1), **Fus-028** (isolado brasileiro de Botucatu-SP FOL raça 2; bioensaio = FOL raça 2), **Fus-439** (isolado brasileiro de Paranapuã-SP, bioensaio = FOL raça 3), **Fus-425** (bioensaio = FOL raça 3), **Fus-440** (bioensaio = FOL raça 1), **Fus-376** (bioensaio = FOL raça 1), **Fus-314** (bioensaio = FOL raça 3), **Fus-420** (bioensaio = FOL raça 1), **Fus-421** (bioensaio = FOL raça 1). M = Marcador 1Kb Plus.

**Tabela 1** – Conjunto de pares de primers específicos para identificação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizados no presente trabalho visando a caracterização de isolados do Brasil.

<b>Pares de Primers</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>	<b>Amplicon esperado (bp)</b>	<b>Referência</b>
<b>Uni F</b> <b>Uni R</b>	ATCATCTTGTGCCAACTTCAG GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA	670 ~ 672	Hirano & Arie (2006)
Sp13 F Sp13 R	GTCAGTCCATTGGCTCTCTC TCCTTGACACCATCACAGAG	445	Hirano & Arie (2006)
<b>Sp23 F</b> <b>Sp23 R</b>	CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA GCAACAGGTCGTGGGGAAAA	518	Hirano & Arie (2006)
P12-F2B (SIX1) P12-R1 (SIX1)	GTATCCCTCCGGATTTTGAGC AATAGAGCCTGCAAAGCATG	947	Rep et al. (2004)
<b>SIX2-F2</b> <b>SIX2-R2</b>	CAACGCCGTTTGAATAAGCA TCTATCCGCTTTCTTCTCTC	992	Van der Does et al. (2008)
SIX3-F1 SIX3-R2	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT GGCAATTAACCACTCTGCC	749	Van der Does et al. (2008)
<b>SIX4-F1</b> <b>SIX4-R1</b>	TCAGGCTTCACTTAGCATA GCCGACCGAAAAACCCTAA	608	Lievens et al. (2009)
SIX5-F1 SIX5-R1	ACACGCTCTACTACTCTTCA GAAAACCTCAACGCGGCAAA	967	Lievens et al. (2009)
<b>SIX6-F1</b> <b>SIX6-R1</b>	CTCTCCTGAACCATCAACTT CAAGACCAGGTGTAGGCATT	793	Lievens et al. (2009)
SIX6-R1 SIX7-R1	CATCTTTTCGCCGACTTGGT CTTAGCACCTTGAGTAAC	862	Lievens et al. (2009)

**Tabela 2** – Determinação de raças fisiológicas em um subgrupo de **107 isolados** de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* coletados no Brasil e previamente identificados como pertencentes às raças 1, 2 e 3 de acordo com bioensaios de inoculação de acessos diferenciais. Análises conduzidas com base na reação de acessos diferenciais de *Solanum (Lycopersicon)* por Gonçalves et al. (2021) e pelos padrões de amplicons obtidos com os primers *Six4* (Lievens et al. 2009) e os primers Uni, Sp13 e Sp23 (Hirano & Arie, 2006 = H&A). Amplicons monomórficos foram observados para todos os isolados quando analisados com os primers *Six1*, *Six2*, *Six3*, *Six5*, *Six6* e *Six7*, com amplicons de 1500, 1050, 750, 850, 1050 e 1250 pares de bases (pb), respectivamente. Os isolados Fus-099, Fus-100 e Fus-102 são isolados padrões internacionais para raça 1. Os quatro isolados assinalados em campo laranja mostraram incongruências entre os resultados dos bioensaios e os padrões moleculares e foram classificados como raça ainda indefinida (RI).

Código do isolado	Local de isolamento	UF	Ano de coleta	Raça bioensaios	<i>Six4</i> (1250 bp)	Uni	Sp13	Sp23	Raça Bioensaio + marcadores*
Fus-099	Estados Unidos	USA	SI**	1	+	+	+	-	1
Fus-100	Tanzânia	TZ	SI	1	+	+	+	-	1
Fus-102	Nova Zelândia	NZ	SI	1	+	+	+	-	1
Fus-022	Botucatu	SP	1989	1	+	+	+	-	1
Fus-023	Belém S. Francisco	PE	1990	2	+	+	+	-	RI
Fus-025	Belém S. Francisco	PE	1991	2	-	+	+	-	2B
Fus-026	Bezerros	PE	1991	2	+	+	+	-	RI
Fus-027	Botucatu	SP	1992	1	+	+	+	-	1
Fus-028	Botucatu	SP	1992	2	+	+	+	-	RI
Fus-029	Uberlândia	MG	1992	1	+	+	+	-	1
Fus-030	Uberlândia	MG	1992	1	+	+	+	-	1
Fus-087	Belém S. Francisco	PE	2002	2	+	+	+	-	RI
Fus-088	Belém S. Francisco	PE	2002	2	-	+	+	-	2B
Fus-090	Venda Nova	ES	2003	3	-	+	+	+	3
Fus-094	Domingos Martins	ES	2004	3	-	+	+	+	3
Fus-143	Venda Nova	ES	2005	3	-	+	+	+	3
Fus-145	Muniz Freire	ES	2006	3	-	+	+	+	3
Fus-149	Muniz Freire	ES	2006	3	-	+	+	+	3
Fus-150	São José Ubá	RJ	2006	3	-	+	+	+	3
Fus-152	São José Ubá	RJ	2006	3	-	+	+	+	3
Fus-155	São José Ubá	RJ	2006	3	-	+	+	+	3
Fus-156	Itaocara	RJ	2006	3	-	+	+	+	3
Fus-168	Gama	DF	2007	3	-	+	+	+	3
Fus-175	Sumidouro	RJ	2008	3	-	+	+	+	3
Fus-191	Gama	DF	2009	3	-	+	+	+	3
Fus-216	Gama	DF	2010	3	-	+	+	+	3
Fus-233	Jaguaquara	BA	2011	3	-	+	+	+	3
Fus-234	Jaguaquara	BA	2011	3	-	+	+	+	3
Fus-235	Gama	DF	2011	3	-	+	+	+	3
Fus-256	Coimbra	MG	2012	3	-	+	+	+	3



Fus-258	Gama	DF	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-259	Nova Friburgo	RJ	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-260	Castelo	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-290	Camocim S. Félix	PE	1997	2	-	+	+	-	2B
Fus-296	Camocim S. Félix	PE	1997	2	-	+	+	-	2B
Fus-297	Camocim S. Félix	PE	1997	2	-	+	+	-	2B
Fus-301	Camocim S. Félix	PE	1997	2	-	+	+	-	2B
Fus-302	Camocim S. Félix	PE	1997	2	-	+	+	-	2B
Fus-303	Camocim S. Félix	PE	1997	2	-	+	+	-	2B
Fus-307	Afonso Cláudio	ES	2012	3	-	+	+	+	3
Fus-309	Marechal Floriano	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-310	Vargem Alta	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-313	Domingos Martins	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-314	Coimbra	MG	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-315	Coimbra	MG	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-316	Nova Friburgo	RJ	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-317	Afonso Cláudio	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-318	Afonso Cláudio	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-319	Castelo	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-320	Paty do Alferes	RJ	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-321	Sta. Maria de Jetibá	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-322	Sumidouro	RJ	2014	3	-	+	+	+	3
Fus-323	Sumidouro	RJ	2014	3	-	+	+	+	3
Fus-324	Sumidouro	RJ	2014	3	-	+	+	+	3
Fus-325	Serra	ES	2014	3	-	+	+	+	3
Fus-326	Marilac	MG	2014	3	-	+	+	+	3
Fus-329	Muniz Freire	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-332	Domingos Martins	ES	2014	3	-	+	+	+	3
Fus-334	São José Ubá	RJ	2014	3	-	+	+	+	3
Fus-335	Venda Nova	ES	2013	3	-	+	+	+	3
Fus-375	Araguari	MG	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-377	Goianápolis	GO	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-378	Gama	DF	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-382	Nerópolis	GO	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-386	Paty do Alferes	RJ	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-388	Paty do Alferes	RJ	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-392	Miguel Pereira	RJ	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-393	Miguel Pereira	RJ	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-394	Miguel Pereira	RJ	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-396	Vassouras	RJ	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-398	Vassouras	RJ	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-399	Vassouras	RJ	2015	3	-	+	+	+	3

Fus-402	Goianápolis	GO	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-403	Nerópolis	GO	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-404	Goianápolis	GO	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-405	Cocalzinho	GO	2015	3	-	+	+	+	3
Fus-423	Jales	SP	2016	3	-	+	+	+	3
Fus-424	Jales	SP	2016	3	-	+	+	+	3
Fus-425	Jales	SP	2016	3	-	+	+	+	3
Fus-430	Cariacica	ES	2017	3	-	+	+	+	3
Fus-434	Brasília	DF	2017	3	-	+	+	+	3
Fus-439	Paranapuã	SP	2017	3	-	+	+	+	3
Fus-458	Venda Nova	ES	2018	3	-	+	+	+	3
Fus-461	São Gabriel	GO	2018	3	-	+	+	+	3
Fus-462	São Gabriel	GO	2018	3	-	+	+	+	3
Fus-468	Nova Friburgo	RJ	2018	3	-	+	+	+	3
Fus-469	Nova Friburgo	RJ	2018	2	-	+	+	-	2B
Fus-481	Tianguá	CE	2018	3	-	+	+	+	3
Fus-511	Carmópolis	MG	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-512	Araguari	MG	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-513	Uberlândia	MG	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-515	Uberlândia	MG	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-516	Campo Limpo	GO	2019	1	+	+	+	-	1
Fus-517	Campo Limpo	GO	2019	1	+	+	+	-	1
Fus-518	Campo Limpo	GO	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-531	Carnaubal	CE	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-532	Carnaubal	CE	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-533	Carnaubal	CE	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-535	Ubajara	CE	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-536	Ubajara	CE	2019	3	-	+	+	+	3
Fus-547	Poçoões	BA	2020	3	-	+	+	+	3
Fus-554	Guaraciaba Norte	CE	2021	3	-	+	+	+	3
Fus-557	Guaraciaba Norte	CE	2021	3	-	+	+	+	3
Fus-559	Guaraciaba Norte	CE	2021	3	-	+	+	+	3
Fus-560	Guaraciaba Norte	CE	2021	3	-	+	+	+	3
Fus-564	Camocim S. Félix	PE	2021	3	-	+	+	+	3
Fus-674	S. Joaquim Monte	PE	2022	3	-	+	+	+	3
Fus-675	S. Joaquim Monte	PE	2022	3	-	+	+	+	3
Fus-676	S. Joaquim Monte	PE	2022	3	-	+	+	+	3
Fus-677	S. Joaquim Monte	PE	2022	3	-	+	+	+	3

Ord.= Ordem; (+) = amplicon presente; (-) = amplicon ausente.

\*Raça definida via caracterização molecular com os *primers SIX4*, Uni, Sp13 e Sp23 e via bioensaios como sendo: FOL raça 1 (**1**); FOL raça 2 cosmopolita (**2**); FOL raça 2 do Brasil (**2B**) e FOL raça 3 (**3**) e raça indefinida (**RI**).

\*\*Isolados padrões internacionais (PI) de FOL raça 1.

## **CAPÍTULO 3**

**Avaliação da estabilidade fenotípica e do efeito de dosagem do gene *I-7*  
contra uma coleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*lycopersici* raça 3**

## **Avaliação da estabilidade fenotípica e do efeito de dosagem do gene *I-7* contra uma coleção de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3**

### **RESUMO**

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) é considerado um dos principais patógenos fúngicos do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), podendo contaminar os solos por longos períodos e provocar elevadas perdas no cultivo em campo. Esse patógeno se caracteriza por invadir os vasos do xilema impedindo o transporte ascendente de seiva. Em condições severas, cultivares suscetíveis apresentam sintomas de murcha e completo colapso das plantas. Três raças fisiológicas de FOL estão amplamente distribuídas e se caracterizam por apresentar interações diferenciais com acessos de tomateiro contendo quatro fatores de resistência dominantes (*I*, *I-2*, *I-3* e *I-7*). As raças 1 e 2 de FOL já foram disseminadas em praticamente todas as principais áreas produtoras de tomate ao redor do mundo. No entanto, isolados da raça 3 vêm se disseminando drasticamente, apresentando uma distribuição cosmopolita. FOL raça 3 tem sido efetivamente controlada pela utilização dos genes *I-3* ou *I-7*. Recentemente, uma potencial raça 4 foi descrita na Califórnia apresentando a capacidade de superar a resistência governada pelo gene *I-3*. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma avaliação da estabilidade fenotípica e do efeito de dosagem do gene *I-7* contra uma coleção representativa de isolados de FOL raça 3. O experimento foi realizado utilizando os acessos ‘BHRS-2,3’ (homozigoto; *I-7/I-7*), ‘BRS Imigrante’ (heterozigoto; *I-7/i-7*) e um acesso suscetível à raça 3 (‘Floradade’; *i-7/i-7*). A dosagem alélica desses acessos foi confirmada via marcadores moleculares codominantes. Esses acessos foram submetidos à inoculação radicular com 27 isolados de FOL raça 3 com 16 repetições em delineamento inteiramente casualizado. Avaliações foram conduzidas 21 dias após a inoculação usando uma escala de notas de 1 a 5. Todos os 27 isolados de FOL analisados foram patogênicos, induzindo severos sintomas no acesso ‘Floradade’ (resistente a isolados das raças 1 e 2). Os acessos ‘BHRS-2,3’ e ‘BRS Imigrante’ apresentaram médias de valores semelhantes de severidade quando avaliados contra os 27 isolados de FOL raça 3, não diferindo significativamente entre si e do tratamento controle (inoculação com água). Os resultados indicaram uma elevada estabilidade fenotípica do gene *I-7*, sendo que nenhum isolado foi capaz de superar a resistência. Além disso, apenas a presença de uma única cópia (= dose) do gene *I-7* se mostrou suficiente para conferir resistência elevada e fenotipicamente estável contra um amplo espectro de isolados de FOL raça 3. A demonstração da estabilidade do gene *I-7* é de extremo interesse para o melhoramento genético do tomateiro em escala global, tendo em vista a recente caracterização de isolados norte-americanos capazes de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *I-3*.

**Palavras chaves:** diversidade, perfil de virulência, murcha vascular, tomateiro, *Solanum lycopersicum*.

## ABSTRACT

### **Evaluation of the stability and dosage effect of the *I-7* gene against a collection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3.**

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) is considered one of the main fungal pathogens of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), which can contaminate the soil for long periods and cause severe yield losses under field conditions. This pathogen is characterized by invading the xylem vessels, preventing the ascending transport of sap. Under severe conditions, susceptible cultivars show wilting symptoms and complete plant collapse. Three physiological races of FOL are widely distributed and are characterized by presenting differential interactions with tomato accessions carrying four dominant resistance factors (*I*, *I-2*, *I-3*, and *I-7*). FOL races 1 and 2 are now widespread in virtually all major tomato growing areas around the world. However, race 3 isolates have been spreading drastically, currently presenting a cosmopolitan distribution. FOL race 3 has been effectively controlled by using either the *I-3* or *I-7* genes. Recently, a potential race 4 was described in California showing the ability to overcome resistance governed by the *I-3* gene. In this context, the objective of the present work was to carry out an evaluation of the phenotypic stability and the dosage effect of the *I-7* gene against a representative collection of FOL race 3 isolates. The experiment was carried out using the accessions ‘BHRS-2,3’ (homozygous; *I-7/I-7*), ‘BRS Imigrante’ (heterozygous; *I-7/i-7*) and a susceptible accession to race 3 (‘Floradade’; *i-7/i-7*). The allelic dosage of these accessions was confirmed via codominant molecular markers. These accessions were submitted to root inoculation with 27 isolates of FOL race 3 with 16 replications in a completely randomized design. Assessments were conducted 21 days after inoculation using a rating scale from 1 to 5. All 27 FOL isolates analyzed were pathogenic, inducing severe symptoms in the accession ‘Floradade’ (resistant to isolates of races 1 and 2). Accessions ‘BHRS-2,3’ and ‘BRS Imigrante’ displayed similar mean severity values when evaluated against the 27 FOL race 3 isolates, not differing significantly from each other and from the control treatment (mock-inoculation with water). The results indicated a high phenotypic stability of the *I-7* gene, with no isolate being able to overcome resistance. Furthermore, only the presence of a single copy (= dose) of the *I-7* gene has been shown to be sufficient to confer high and phenotypically stable resistance against a broad spectrum of FOL race 3 isolates. The demonstration of the *I-7* gene stability is of extreme interest for tomato breeding on a global scale, in view of the recent characterization of North American isolates capable of “breaking-down” the resistance conferred by the *I-3* gene.

**Keywords:** diversity, virulence profile, vascular wilt, tomato, *Solanum lycopersicum*.

## INTRODUÇÃO

As espécies de *Fusarium* constituem um importante grupo de fitopatógenos que apresenta um amplo perfil de virulência e patogenicidade em diversas espécies vegetais (Summerell, 2019). O complexo *Fusarium oxysporum* está presente na maioria das regiões produtoras no mundo, induzindo murchas vasculares através da invasão das plantas hospedeiras por fissuras ou ferimentos nas raízes que favorecem a penetração e colonização do sistema radicular (Kuramae & Souza, 2008; Summerell, 2019). Após a infecção do patógeno nas raízes da planta hospedeira, os vasos do xilema são colonizados e secretadas enzimas e proteínas responsáveis por suprimir o sistema de defesa da planta. Estas proteínas secretadas tem as funções de promovem a propagação do fungo, agindo na supressão de mecanismos de defesa no hospedeiro (Rep et al., 2004). A virulência a um hospedeiro em particular é determinada por um conjunto de proteínas efetoras secretadas dentro da planta durante o processo de colonização dos tecidos vegetais. Estudos relacionados ao proteoma da seiva do xilema de plantas infectadas revelaram 33 proteínas diferentes, dentre estas 13 estão presentes a plantas infectadas, sendo sete delas de origem fúngica. (Houterman et al., 2007). Os sintomas provocados por estes fitopatógenos nas hospedeiras podem variar de murchas vasculares, amarelecimentos foliares, escurecimentos vasculares, podridões radiculares, necrose no caule na região do colo, reduções no crescimento e tombamentos em plântulas jovens (Rep et al., 2004).

A murcha vascular do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) tem como agente casual o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen (FOL), sendo considerada uma das principais doenças da cultura. A grande produção de esporos, fácil disseminação e capacidade de sobreviver no solo por longos períodos na ausência de plantas hospedeiras tornou este fitopatógeno de importância global para a cultura (Catanzariti et al., 2017; Ma et al., 2023). Atualmente estão descritas três raças de FOL que infectam a cultura do tomateiro. A identificação destas raças se dá através da capacidade do patógeno infectar ou não um conjunto distinto de acessos de *S. lycopersicum* e *S. pennellii* Correll que contêm fatores específicos de resistência a cada raça do fungo. Estes fatores de resistência específicos para a raça correspondem a quatro genes dominantes (*I*, *I-2*, *I-3* e *I-7*) já caracterizados em acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*). Ao longo dos anos, através do melhoramento genético estes genes foram introgrididos em variedades comerciais (Gonzalez-Cendales et al., 2016).

O primeiro gene de resistência a FOL foi introgridido de *S. pimpinellifolium* L. acesso

‘PI79532’, o gene *I* (= *Immunity*), localizado no cromossomo 11 (Paddock, 1950; Stall & Walter, 1965), que confere resistência exclusiva a isolados de FOL raça 1 (Bohn & Tucker, 1939). Contudo, sua efetividade no controle da doença foi relativamente curta, devido ao rápido surgimento isolados de FOL raça 2 (Alexander & Tucker, 1945). A descoberta do gene *I-2* (também localizado no cromossomo 11) no acesso de *S. pimpinellifolium* ‘PI126915’, viabilizou o controle genético da raça 2. O gene *I-2* confere resistência à raça 2 por meio da codificação de uma proteína rica em leucina, semelhante às encontradas em um grande número de espécies vegetais (Stall & Walter, 1965). Este gene foi utilizado por um longo período de tempo em cultivares comerciais de tomateiro, porém essa resistência foi quebrada com o surgimento de isolados de FOL raça 3 no início da década de 1980 (Grattidge & O’Brien, 1982; Volin & Jones, 1982), forçando a busca pelos programas de melhoramento de novas fontes de resistência para esta variante do patógeno. Estes esforços de pesquisa permitiram a identificação de dois genes, ambos introgrididos de *S. pennellii*, que conferem resistência contra isolados de FOL raça 3. O gene dominante, *I-3* (localizado no cromossomo 7) foi identificado no acesso ‘LA716’ (Scott & Jones, 1989) e codifica uma proteína quinase semelhante ao receptor S (Catanzariti et al., 2015). Mais recentemente, foi caracterizado o gene *I-7* no acesso ‘PI-414773’, localizado no cromossomo 8, (Lim et al., 2006), responsável por codificar uma proteína semelhante ao receptor de repetição rica em leucina que confere uma resistência de amplo espectro às três raças de FOL (Gonzalez-Cendales et al., 2016).

Isolados das raças 1 e 2 de FOL estão disseminados em praticamente todas as principais áreas produtoras de tomate ao redor do mundo (Kuramae & Souza 2002; Sibounnavong et al., 2012; Debbi et al., 2018). A distribuição geográfica da raça 3 vem se expandindo drasticamente, sendo relatada em diversas regiões produtoras nos EUA, México, Austrália, Turquia, Argélia, Coreia do Sul, Chile, Argentina e China (Gonçalves et al., 2021). No Brasil, isolados da raça 3 estão presentes em praticamente todos os principais Estados produtores e têm sido eficientemente controlados por cultivares/porta-enxertos de tomateiro contendo os genes *I-3* e *I-7* (Gonçalves et al., 2021). Recentemente, uma potencial raça 4 foi descrita na Califórnia apresentando a capacidade de superar a resistência governada pelo gene *I-3*. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma avaliação da estabilidade fenotípica bem como do efeito de dosagem do gene *I-7* contra uma coleção representativa de isolados de FOL raça 3.

## MATERIAL & MÉTODOS

**Origem dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*** – Foram utilizados 27 isolados de FOL raça 3 (obtidos de nove Estados brasileiros) e previamente identificados por ensaios de virulência e com marcadores moleculares (Gonçalves et al., 2021). Foram selecionados três isolados de FOL raça 3 por Estado (**Tabela 1**). Os fungos utilizados neste trabalho foram mantidos em microtubos e conservados pelo método de Castellani (1963). Culturas puras foram armazenadas em temperatura de 10 °C em câmara fria. A repicagem dos isolados foi realizada em uma câmara de fluxo laminar através da transferência dos discos de micélio contendo material fúngico para placas de Petri, contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) + tetraciclina (50 µg/mL). As placas foram devidamente identificadas e vedadas com filme plástico, incubadas em temperatura ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) por um período de sete dias em condições de fotoperíodo de 12 horas de luz. Após este período, no dia da inoculação, foi adicionado 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri. Com auxílio de uma escova de cerdas macias, os conídios foram separados dos conidióforos e a suspensão foi filtrada, através de duas camadas de gaze, para retirada de micélio e restos de meios de cultura. A concentração inicial de conídios na suspensão foi estimada, com o auxílio de um hemacitômetro, e em seguida ajustada para  $1 \times 10^6$  conídios/mL.

**Preparo das mudas de tomates e inoculação** – Para avaliar a estabilidade e o efeito da dosagem do gene *I-7* foram utilizados os seguintes acessos: **(1)** ‘Floradade’ (resistente a isolados de FOL raças 1 e 2 devido a presença em homozigose dos genes *I-1/I-1*; *I-2/I-2*, mas suscetível a isolados da raça 3 devido a presença em homozigose dos alelos recessivos *i-3/i-3*; *i-7/i-7*); **(2)** ‘BHRS-2,3’ (presença em homozigose do locus *I-7* que confere resistência as três raças de FOL, mas destituído do gene de resistência *I-3*, apresentando o genótipo *i-3/i-3*) e **(3)** o híbrido comercial ‘BRS Imigrante’ (com a presença do locus em heterozigose *I-7/i-7*, mas destituído do gene de resistência *I-3*, apresentando o genótipo *i-3/i-3*). A análise da condição alélica de cada acesso foi confirmada usando um sistema de marcadores desenvolvido no âmbito desta dissertação (**ver capítulo 4**). Os acessos foram semeados em bandejas de isopor utilizando substrato esterilizado (Bioplant<sup>®</sup>) e mantidas em casa de vegetação sob condições ambiente, com duas irrigações diárias (uma no período da manhã e outra no período da tarde). Após 13 dias do plantio (DAP) apresentando dois pares de folhas verdadeiras, as mudas foram removidas das bandejas cuidadosamente e suas raízes lavadas em água corrente para retirar todo substrato aderido às mesmas. A porção apical das raízes foi cortada (aproximadamente 2 cm)



com auxílio de uma tesoura e as mudas mergulhadas em suspensão de esporos de FOL por 5 minutos. Em seguida as plantas inoculadas e plantas controles (tratadas somente com água destilada e esterilizada) foram transplantadas para vasos de 1,5 L previamente umedecidos (irrigados um dia anteriormente) contendo uma mistura autoclavada de 69,6 % de solo de barranco, 10 % de areia lavada, 10 % substrato comercial, 10 % de palha de arroz 0,1 % de calcário ( $\text{CaCO}_3$ ), 0,25 % de superfosfato simples  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  e 0,055 % de sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Após o transplante das mudas, foram adicionados 5 mL da suspensão de conídios no colo de cada plântula. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições por tratamento (isolados de FOL). Após 21 dias da inoculação foi realizado a avaliação do experimento usando uma escala de notas variando de 1 a 5, adaptada por Santos (1999), sendo o **1** = plantas sem sintomas; **2** = plantas sem sintomas de amarelecimento ou murcha, mas apresentando escurecimento vascular; **3** = plantas apresentando início de amarelecimento foliar ou murcha associados a escurecimento vascular intenso; **4** = plantas com amarelecimento e necrose foliar associadas a murcha intensa e **5** = plantas mortas. Com base nas notas recebidas às plantas foram classificadas em resistentes ( $R \leq 3$ ) e suscetíveis ( $S > 3$ ). As plantas foram classificadas como suscetíveis somente quando os sintomas característicos da doença foram observados. Os dados resultantes da avaliação foram tabulados e submetidos a testes estatísticos paramétricos, normalidade e homogeneidade de comparação de médias no programa R Studio.

## RESULTADOS

A virulência e agressividade dos isolados de FOL, utilizados no presente estudo e oriundos de nove estados produtores de tomate, foi analisada empregando uma escala de notas variando de 1 a 5, adaptada de Santos (1999) (**Figuras 1 & 2**), sendo dividido o grau de virulência em cinco classes de reação: resposta similar a imunidade (**SI**), com nota = 1; alta resistência (**AR**), nota entre 1,01 a 2,00; resistência moderada (**RM**), nota entre 2,01 a 3,00; suscetível (**SU**), nota entre 3,01 a 4,00; altamente suscetível (**AS**), com nota entre de 4,01 a 5,00 (**Figura 2**). Todos os isolados avaliados se mostraram patogênicos ao acesso 'Floradade' (suscetível a raça 3) (**Tabela 1 & Figura 2**). O tratamento controle não apresentou sintomas de murcha, escurecimento e seca, e suas médias foram estatisticamente semelhantes aos acessos 'BHRS-2,3' e 'BRS Imigrante' (**Tabela 1**).

Dentre os 27 isolados de FOL analisados neste trabalho as maiores notas de agressividade foram observadas no acesso 'Floradade', de acordo com o teste Scott-Knott foram Fus-676, Fus-

677, Fus-532, Fus-481, Fus-424, Fus-256, Fus-233, Fus-260, Fus-216, Fus-235, Fus-233 e Fus-434 (**Tabela 1**). Os isolados que apresentaram valores intermediários de agressividade não diferindo entre si estatisticamente foram Fus-675, Fus-554, Fus-423, Fus-425, Fus-314, Fus-326, Fus-234, Fus-547, Fus-143, Fus-321, Fus-060, Fus-403, Fus-518, Fus-150, Fus-156 e Fus-334 (**Tabela 1**). Os acessos ‘BHRS-2,3’ e ‘BRS Imigrante’ apresentaram médias de valores semelhantes de índice de doença quando testados os 27 isolados de FOL raça 3, não diferindo estatisticamente.

A cultivar de tomate ‘Floradade’ se mostrou altamente suscetível para todos os isolados de FOL, apresentando sintomas de murcha na parte aérea das plantas, amarelecimento e necrose foliar e escurecimento vascular no caule (**Figura 1**). De acordo com o teste estatístico Tukey a nível de significância de 5%, o acesso ‘Floradade’ apresentou maiores médias de severidade quando comparadas com ‘BHRS-2,3’ e ‘BRS Imigrante’. Por sua vez, foram observadas reações incompatíveis de todos os isolados após inoculação de plantas dos acessos ‘BHRS-2,3’ e ‘BRS Imigrante’ (**Figura 1**). Por sua vez, os acessos ‘BHRS-2,3’ (homozigoto para o *I-7*) e ‘BRS Imigrante’ (heterozigoto para o *I-7*) apresentaram valores médios de severidade estatisticamente semelhantes entre si, com poucos sintomas de amarelecimento foliar e poucas/ou nenhuma necrose vascular. O tratamento controle inoculado apenas com água apresentou valores de médias semelhantes estatisticamente para os três acessos (**Tabela 2**).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, foi realizado um trabalho de avaliação da estabilidade fenotípica do gene de resistência *I-7* inoculando 27 isolados de FOL raça 3, obtidos em nove estados produtores de tomate. Foi utilizado como controle suscetível ao patógeno o acesso ‘Floradade’ resistente às raças 1 e 2 condicionada pelo locus *I-2* que codifica proteínas do tipo CC-NB-LRR (Simons et al., 1998). Após 21 dias da inoculação a presença de sintomas severos de ataque do patógeno foi detectada com murcha intensa associada ao amarelecimento, necrose foliar e escurecimento vascular. De acordo com Lievens et al (2009) o surgimento de sintomas de ataque do patógeno na planta hospedeira ocorre através de fatores de virulência que são capazes de suprimir os genes de resistência *I* e *I-2*. Estudos realizados por Catanzariti et al (2017) revelaram que ambos os genes *I* e *I-2* estão localizados no cromossomo 11 e não são capazes de suprimir o ataque de FOL raça 3. Variações de agressividade entre isolados de FOL raça 3 foram observadas em relação ao acesso suscetível ‘Floradade’ (**Figuras 1 & 2**), sendo que 11 isolados apresentaram médias superiores e 16 isolados apresentaram valores intermediários de níveis de significância (**Tabela 1**). Esta variação ocorre devido à perda de agressividade e virulência do isolado que pode desencadear-se à medida que fica armazenado e submetido a sucessivos processos de repicagem, variações de temperaturas diurnas e noturnas, tempo de armazenamento e T °C na realização dos testes (Doohan et al., 2003; Boix-Ruíz et al., 2015).

O acesso ‘BHRS-2,3’ possui o gene *I-7* em homozigose, introduzido a partir de um acesso de *S. pennellii*, sendo utilizado como tratamento resistente contra o grupo de isolados de FOL raça 3. O gene *I-7* está localizado no cromossomo 8 sendo responsável por codificar uma proteína semelhante ao receptor LRR que exibe uma resistência de amplo espectro (Gonzalez-Cendales et al. 2016). Estudos avaliando famílias F<sub>2</sub> segregantes para os genes *I-7* e EDS 1 (Enhanced Disease Susceptibility 1) revelaram que a eficiência da codificação de uma proteína LRR-RLPs, incluindo *Cf-9* e *Ve1* é dependente do EDS 1 que é uma proteína semelhante à lipase, que está envolvida na ativação de defesa da planta hospedeira (Hu et al., 2005). Isto mostra claramente que o sucesso da resistência de amplo espectro as raças de FOL mediada por *I-7* é diretamente dependente do gene EDS1 (Gonzalez-Cendales et al. 2016). No tratamento resistente ‘BHRS-2,3’ com o gene em homozigose, inoculados com FOL raça 3 não houve sintomas severos da doença (**Figura 1**). Os isolados apresentaram médias inferiores a 1,4 = sendo classificado como altamente resistente (**Tabela 1**) não houve diferenças estatísticas da testemunha controle resistente (**Figura 2**)

Para avaliação do material heterozigoto para o gene *I-7* foi utilizado o híbrido comercial

‘BRS Imigrante’, também submetido a inoculação radicular com 27 isolados de FOL raça 3. Os resultados de agressividade apresentaram médias inferiores a 1,3 = classificados como altamente resistente (**Tabela 1**) não diferindo estatisticamente do acesso ‘BHRS-2,3’ e da testemunha inoculada com água destilada que apresentou média de 1 (= semelhante a classe de reação imune) (**Figura 2**). Estudos revelaram que a pequena família de genes do tomate que *I-7* inclui um homólogo no cromossomo 6 que não confere resistência a FOL e um homólogo no cromossomo 8 adjacente ao *I-7*, porém não se pode descartar que o homólogo do cromossomo 8 também desempenhe um papel de resistência a FOL, mesmo apresentando uma divergência na sequência de aminoácidos, podendo agir como um co-receptor (Liebrand et al., 2013; Bi et al., 2016).

O estudo revelou uma estabilidade genética do híbrido F1 heterozigoto (‘BRS Imigrante’), quando submetido ao teste de patogenicidade com isolados de FOL raça 3 de diferentes regiões, evidenciando que a presença de uma única cópia do gene dominante (*I-7/i-7*) em conjunto com gene EDS1 é suficiente para codificação de proteína LRR-RLPs e desencadear a sinalização de defesa de amplo espectro por meio do reconhecimento desta variante do patógeno. Estudos realizados por Dixon et al. (1996) revelaram que existem outras proteínas codificadas pelos genes *Cf-2* e *Cf-9* presentes em tomateiro e em fumo que desempenham um papel semelhante na resistência a *Fulvia fulva* (Cooke) Cif. (1954). A proteína codificada pelo gene *Ve1* presente no tomateiro confere resistência contra o patógeno *Verticillium dahliae* Kleb. (1913) raça 1 (Kawchuk et al., 2001). O tomateiro possui receptores *Eix1* e *Eix2* que mediam a percepção da xilanase indutora de etileno (EIX) derivada da parede celular da espécie *Trichoderma* desencadeando mecanismos de defesa contra o fungo (Ron & Avni, 2004). Desta forma, o reconhecimento de diferentes patógenos se dá através de um conjunto de domínios LRR dessas proteínas que se diferem na sequência de resíduos não LRR e no número de repetições. Porém essas proteínas contêm regiões que vão de 11 C- terminais e 3 LRRs N-terminais conservadas. Estas variações intervenientes estão envolvidas no reconhecimento de proteínas microbianas não-específicas e específicas com fatores de virulência dos patógenos (Thomas et al., 1997; Chakrabarti et al., 2009; Wulff et al., 2009). Contudo o gene *I-7* localizado no cromossomo 8 possui uma alta estabilidade na codificação de proteína semelhante ao receptor LRR e exibindo uma resistência de amplo espectro em acessos homozigotos e heterozigotos F1.

A resistência genética através da incorporação dos genes raça-específicos em cultivares comerciais de tomateiro tem sido a estratégia de controle de FOL mais viável tanto no ponto de vista econômico quanto ecológico. Recentemente, uma potencial raça 4 foi descrita na Califórnia

apresentando a capacidade de superar a resistência governada pelo gene *I-3* (Swett et al., 2023). Neste contexto, a confirmação da estabilidade do gene *I-7* contra uma ampla coleção de isolados de FOL raça 3 é de extremo interesse para o melhoramento genético do tomateiro em escala global, tendo em vista a recente caracterização de isolados norte-americanos capazes de “quebrar” a resistência conferida pelo gene *I-3* (Swett et al., 2023). No entanto, uma recente detecção de isolado capaz de infectar plantas contendo o gene *I-7* no Brasil pode representar uma potencial ameaça para a estabilidade fenotípica de gene (Oliveira et al., 2023).

## CONCLUSÕES

- Todos os 27 isolados de FOL raça 3 foram virulentos apresentando reação compatível (+) com o acesso ‘Floradade’ (classificado como suscetível), induzindo severos sintomas.
- Os acessos ‘BHRS-2,3’ (homozigoto *I-7/I-7*) e ‘BRS Imigrante’ (heterozigoto *I-7/i-7*) apresentaram reações incompatíveis (-) com os isolados de FOL raça 3 induzindo severidade de sintomas com médias inferiores a 1,4 (= altamente resistente), indicando elevados níveis de estabilidade fenotípica do gene *I-7*.
- Os resultados também indicaram que a presença de uma única cópia do gene dominante (*I-7*) é suficiente para codificação de proteína LRR-RLPs e desencadear a sinalização de defesa de amplo espectro contra isolados de FOL.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER LJ, TUCKER CM (1945). Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Agricultural Research, 70(9), 303–313.

BI G, LIEBRAND TWH, BYE RR, POSTMA J, VAN DER BURGH AM, ROBATZEK S, XU X, JOOSTEN, MHA J (2016). SOBIR1 requires the GxxxG dimerization motif in its transmembrane domain to form constitutive complexes with receptor-like proteins. Molecular Plant Pathology, 17(1), 96–107.

BOHN GW, TUCKER CM (1939). Immunity to Fusarium wilt in the tomato. Science, 89(2322), 603–604.

BOIX-RUIZ A, GÁLVEZ-PATÓN L, DE CARA-GARCÍA M, PALMERO-LLAMAS D, CAMACHO-FERRE F, TELLO-MARQUINA, JC (2015). Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Phytoparasitica, 43(4), 471–483.

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

CATANZARITI AM, DO HT, BRU P, DESAIN M, THATCHER LF, REP M, JONES DA (2017). The tomato I gene for Fusarium wilt resistance encodes an atypical leucine-rich repeat receptor-like protein whose function is nevertheless dependent on SOBIR1 and SERK3/BAK1. The Plant Journal, 89(6), 1195–1209.

CATANZARITI AM, LIM GT, JONES DA (2015). The tomato *I-3* gene: A novel gene for resistance to Fusarium wilt disease. New Phytologist, 207(1), 106–118.

CHAKRABARTI A, PANTER SN, HARRISON K, JONES JDG, JONES DA (2009). Regions of the Cf-9B disease resistance protein able to cause spontaneous necrosis in *Nicotiana benthamiana* lie within the region controlling pathogen recognition in tomato. Molecular Plant–Microbe Interactions, 22, 1214–1226.

DEBBI A, BOUREGHDA H, MONTE E, HERMOSA R (2018). Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* associated with tomato diseases in Algeria and a biocontrol strategy with indigenous *Trichoderma* spp. *Frontiers in Microbiology*, 9(282), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00282>.

DIXON MS, JONES DA, KEDDIE JS, THOMAS CM, HARRISON K, JONES JDG (1996). The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*, 84, 451–459.

DOOHAN FM, BRENNAM J, COOKE BM (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109(1), 755–768.

GONÇALVES AM, CABRAL CS, REIS A, FONSECA MEN, COSTA H, RIBEIRO F H S, BOITEUX LS (2021). A three-decade survey of Brazilian *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races assessed by pathogenicity tests on differential tomato accessions and by molecular markers. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 873–884.

GONZALEZ-CENDALES Y, CATANZARITI AM, BAKER B, MCGRATH DJ, JONES DA (2016). Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 448–463.

GRATTIDGE R, O'BRIEN RG (1982). Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease*, 66(2), 165–166.

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

KAWCHUK LM, HACHEY J, LYNCH DR, KULCSAR F, VAN ROOIJEN, G, WATERER DR, ROBERTSON A, KOKKO E, BYERS R, HOWARD RJ, FISCHER R, PRÜFER D (2001). Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences USA, 98, 6511– 6515.

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

LIEBRAND TWH, VAN DEN BERG GM, ZHANG Z, SMIT P, CORDEWENER JHG, AMERICA AHP, SKLENARD J, JONES AME, TAMELING WIL, ROBATZEK S, THOMMA BPHJ, JOOSTEN MHAJ (2013). Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110, 10010–10015.

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

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

MA M, TAYLOR PW, CHEN D, VAGHEFI N, HE JZ (2023). Major soilborne pathogens of field processing tomatoes and management strategies. *Microorganisms*, 11(2), 263.

OLIVEIRA CMD, CARMO MGFD, FERREIRA LM, ROCHA MDS, DINIZ CS, AMARAL-SOBRINHO NMBD (2023). Control failures of *Fusarium* wilt on tomatoes and resistance of cultivars to the three races of the pathogen. *Revista Ceres*, 70, 82–90

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

REP M, VAN DER DOES C, MEIJER M, VAN WIJK R, HOUTERMAN PM, DEKKER HL,



KOSTER CG, CORNELISSEN BJC (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for *I-3*-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*, 53, 1373–1383.

RON M, AVNI A (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *The Plant Cell*, 16, 1604–1615.

SANTOS JRM (1999). Protocolo de Tecnologia: Tomateiro/ Murcha de fusário (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Comunicado Técnico, N o 11. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças 4pp.

SCOTT JW, JONES JP (1989). Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. *Euphytica*, 40(1), 49–53.

SIBOUNNAVONG P, SIBOUNNAVONG P, KANOKMEDHAKUL S, SOYTONG K (2012). Antifungal activities of *Chaetomium brasiliense* CB01 and *Chaetomium cupreum* CC03 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2. *Journal of Agricultural Technology*, 8(3), 1029–1038.

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

SWETT CL, DEL CASTILLO MÚNERA J, HELLMAN E, HELPIO E, GASTELUM M, LOPEZ RAYMUNDO E, JOHNSON H., OGUCHI R, HOPKINS A, BEAULIEU J, RODRIGUEZ F (2023). Monitoring for a new *I3* resistance gene-breaking race of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fusarium* wilt) in California processing tomatoes following recent widespread adoption of resistant (F3) cultivars: Challenges with race 3 and 4 differentiation methods. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1088044.

STALL R E, WALTER JM (1965). Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of races 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology*, 55(11), 1213–1215.

SUMMERELL, BA (2019). Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. Annual Review of Phytopathology, 57, 323–339.

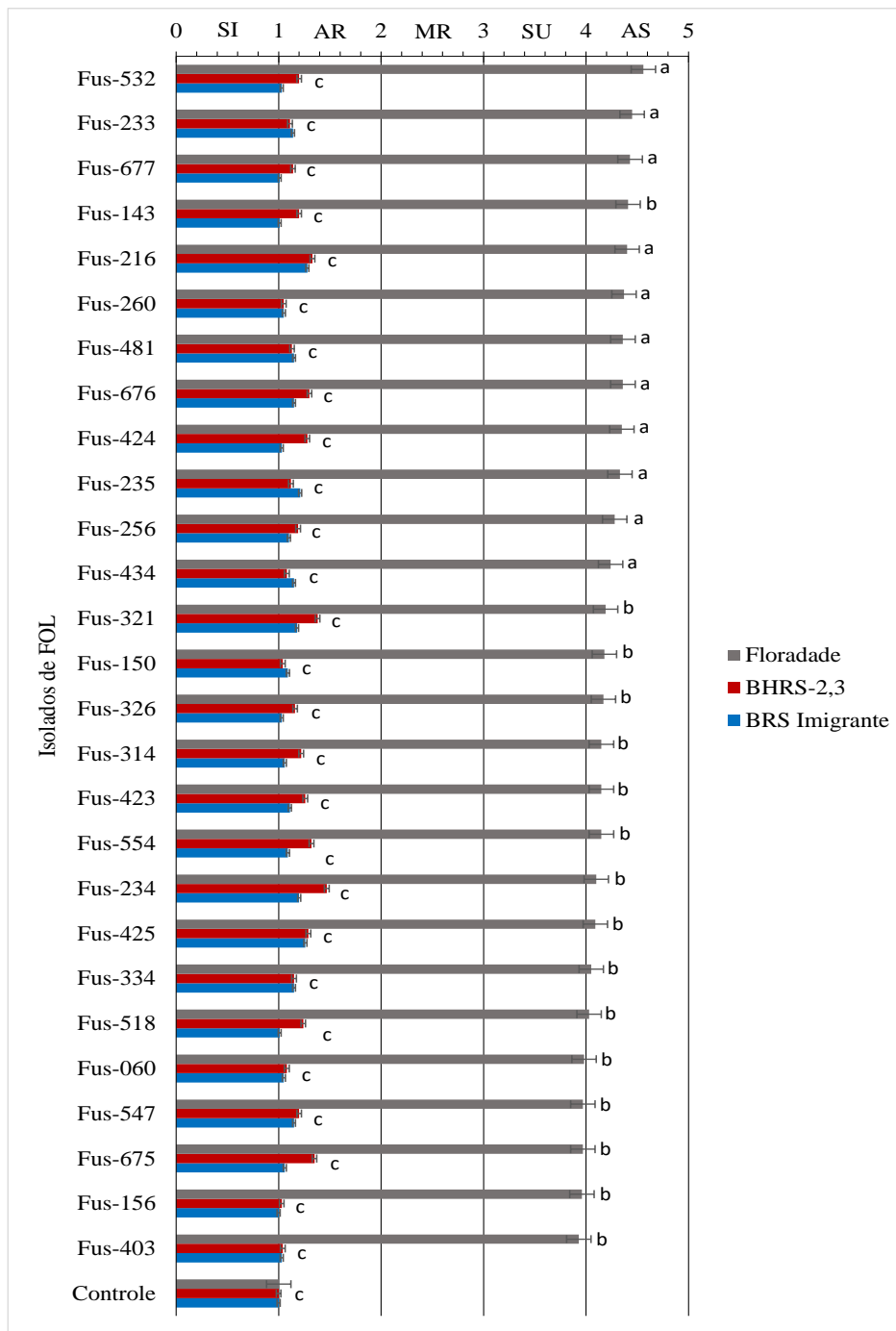
THOMAS CM, JONES DA, PARNISKE M, HARRISON K, BALINT-KURTI PJ, HATZIXANTHIS K, JONES JDG (1997). Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. Plant Cell, 9, 2209–2224.

VOLIN RB, JONES JP (1982). A new race of Fusarium wilt of tomato in Florida and sources of resistance. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 95, 268–269.

WULFF BBH, HEESE A, TOMLINSON-BUHOT L, JONES DA, DE LA PENA M, JONES JDG (2009). The major specificity-determining amino acids of the tomato *Cf-9* disease resistance protein are at hypervariable solvent-exposed positions in the central leucine-rich repeats. Molecular Plant–Microbe Interactions, 22, 1203–1213.



**Figura 1** – Acessos de tomateiro inoculados com isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3. **A:** Acesso ‘BHRS 2,3’ apresentando resistência ao FOL raça 3 devido a presença do locus *I-7* em homozigose. **B:** Híbrido comercial ‘BRS Imigrante’ apresentando resistência aos isolados FOL raça devido a presença de locus *I-7* em heterozigose. **C:** Cultivar ‘Floradade’ apresentando sintomas severos resultante do ataque do patógeno devido a ausência de genes de resistência contra isolados de FOL raça 3. **D, E & F:** Plantas controle correspondente a cada acesso, inoculadas com água destilada.



**Figura 2** – Reação de acessos de tomateiro ‘Floradade’ (*I-2/I-2; i-3/i-3; i-7/i-7*); ‘BHRS-2,3’ (*I-2/I-2; i-3/i-3; I-7/I-7*) e ‘BRS Imigrante’ (*I-2/I-2; i-3/i-3; I-7/i-7*). Os acessos foram inoculados com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 e as interações foram descritas de acordo com classes de reação planta/patógeno: resposta similar a imunidade (SI), notas de severidade igual a 1; altamente resistente (AR), notas entre 1,01 a 2,00; resistência moderada (RM), notas entre 2,01 a 3,00; suscetível (SU), notas entre 3,01 a 4,00 e altamente suscetível (AS), notas entre 4,01 a 5,00;

**Tabela 1** – Descrição dos 27 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3 utilizados nos testes de patogenicidade contra um conjunto de acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), ‘Floradade’ (I-2/I-2; i-3/i-3; i-7/i-7), ‘BHRS-2,3’ (I-2/I-2; i-3/i-3; I-7/I-7) e o híbrido comercial ‘BRS Imigrante F1’ (I-2/I-2; i-3/i-3; I-7/i-7).

Ordem	Código do Isolado	Local de Isolamento	UF	Ano de Coleta	Espécie	Acessos de tomateiro*					
						‘Floradade’		‘BHRS-2,3’		‘BRS Imigrante’	
						R	A	R	A	R	A
1	Fus-675	São Joaquim do Monte	PE	2022	FOL	+	3,97 b	-	1,35 c	-	1,06 c
2	Fus-676	São Joaquim do Monte	PE	2022	FOL	+	4,36 a	-	1,30 c	-	1,15 c
3	Fus-677	São Joaquim do Monte	PE	2022	FOL	+	4,43 a	-	1,14 c	-	1,01 c
4	Fus-532	Carnaubal	CE	2019	FOL	+	4,56 a	-	1,20 c	-	1,03 c
5	Fus-481	Tianguá	CE	2019	FOL	+	4,36 a	-	1,13 c	-	1,15 c
6	Fus-554	Guaraciaba do Norte	CE	2021	FOL	+	4,15 b	-	1,32 c	-	1,09 c
7	Fus-423	Jales	SP	2016	FOL	+	4,15 b	-	1,26 c	-	1,11 c
8	Fus-424	Jales	SP	2016	FOL	+	4,35 a	-	1,28 c	-	1,03 c
9	Fus-425	Paranapuã	SP	2017	FOL	+	4,09 b	-	1,29 c	-	1,26 c
10	Fus-256	Coimbra	MG	2012	FOL	+	4,28 a	-	1,19 c	-	1,10 c
11	Fus-314	Coimbra	MG	2013	FOL	+	4,15 b	-	1,22 c	-	1,06 c
12	Fus-326	Marilac	MG	2014	FOL	+	4,17 b	-	1,16 c	-	1,03 c
13	Fus-233	Jaguaquara	BA	2011	FOL	+	4,45 a	-	1,11 c	-	1,14 c
14	Fus-234	Jaguaquara	BA	2011	FOL	+	4,10 b	-	1,47 c	-	1,20 c
15	Fus-547	Poções	BA	2020	FOL	+	3,97 b	-	1,20 c	-	1,15 c
16	Fus-143	Venda Nova	ES	2005	FOL	+	4,41 b	-	1,20 c	-	1,01 c
17	Fus-260	Castelo	ES	2013	FOL	+	4,37 a	-	1,05 c	-	1,05 c
18	Fus-321	Santa Maria de Jetibá	ES	2013	FOL	+	4,19 b	-	1,38 c	-	1,18 c
19	Fus-216	Gama	DF	2010	FOL	+	4,40 a	-	1,33 c	-	1,28 c
20	Fus-235	Gama	DF	2011	FOL	+	4,33 a	-	1,12 c	-	1,21 c
21	Fus-434	Brasília	DF	2017	FOL	+	4,24 a	-	1,08 c	-	1,15 c
22	Fus-060	Corumbá de Goiás	GO	1994	FOL	+	3,98 b	-	1,08 c	-	1,05 c

23	Fus-403	Nerópolis	GO	2015	FOL	+	3,93 b	-	1,04 c	-	1,03 c
24	Fus-518	Campo Limpo	GO	2019	FOL	+	4,03 b	-	1,24 c	-	1,01 c
25	Fus-150	São José Ubá	RJ	2006	FOL	+	4,18 b	-	1,04 c	-	1,09 c
26	Fus-156	Itaocara	RJ	2006	FOL	+	3,96 b	-	1,03 c	-	1,00 c
27	Fus-334	São José Ubá	RJ	2014	FOL	+	4,05 b	-	1,15 c	-	1,15 c
28	Controle	Inoculado com água	-	-	-	-	1,00 c	-	1,00 c	-	1,00 c
CV**							22,90%				

\*Valores de medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05\%$ )

\*\*Coeficiente de Variação (%).

Códigos: Reação patógeno/hospedeiro (R); Agressividade (A); Reação compatível (+); Reação incompatível (-)

**Tabela 2** – Avaliação dos acessos ‘Floradade’, ‘BHRS-2,3’ e o híbrido comercial ‘BRS Imigrante’ submetidos a inoculação de vinte e sete isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raça 3, oriundos de nove regiões produtoras de tomate brasileiras. Analisados estatisticamente através de teste estatístico Tukey (significância de 5%).

Acessos	Condição alélica dos genes de resistência****	Isolados de FOL raça 3*	
		Reação***	Média
‘Floradade’	<i>I-2/I-2; i-3 /i-3; i-7/i-7</i>	+	4,20 a*
‘BHRS-2,3’	<i>I-2/I-2; i-3 /i-3; I-7/I-7</i>	-	1,20 b
‘BRS Imigrante’	<i>I-2/I-2; i-3 /i-3; I-7/i-7</i>	-	1,10 bc
Controles	Mock-inoculados	-	1,00 c
CV**			23,1%

\*Valores de medias seguidos pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Tukey (P≤0,05).

\*\*Coeficiente de Variação (%).

\*\*\*Reação patógeno/hospedeiro (R): Reação compatível (+) e Reação incompatível (-).

\*\*\*\* Condição alélica avaliada via marcadores moleculares co-dominantes.

## **CAPÍTULO 4**

**Desenvolvimento e validação de marcadores moleculares funcionais para monitorar a incorporação do gene *I-7* em acessos de tomateiro**



## **Desenvolvimento e validação de marcadores moleculares funcionais para monitorar a incorporação do gene *I-7* em acessos de tomateiro**

### **RESUMO**

O controle genético tem sido uma das principais ferramentas que auxiliam no manejo sustentável de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersisci* (FOL), agente causal da murcha de fusário, na cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Atualmente, três raças fisiológicas de FOL se encontram amplamente distribuídas no mundo, que têm sido controladas por um repertório diversificado de genes de resistência (*I*, *I-2*, *I-3* e *I-7*). Esses fatores de resistência são capazes de suprimir o ataque contra raças específicas do patógeno. Uma exceção é o gene *I-7* (localizado no cromossomo 8) que possui um mecanismo de ação que confere uma resistência de amplo espectro contra todas as raças de FOL. O gene *I-7* foi recentemente clonado e é representante de uma nova classe de genes de resistência. Mesmo com toda a disponibilidade da informação estrutural e do posicionamento genômico do *I-7*, não existe, até o momento, marcadores funcionais e codominantes validados para identificar a presença e o estado alélico desse gene em acessos de tomateiro. Esses marcadores são importantes ferramentas na genotipagem de plantas em programas de melhoramento. Neste contexto, um novo marcador funcional, codominante do tipo CAPS (= *cleaved amplified polymorphic sequence*) foi desenvolvido e validado. Para tal, foi obtida uma população F<sub>2</sub> segregante para o gene *I-7* e submetidos a teste de inoculação com cinco isolados de FOL raça 3. Após 21 dias as plantas foram avaliadas usando uma escala de notas e submetidos a testes estatísticos. Amostras foliares de plantas com e sem sintomas foram coletadas e o DNA genômico foi extraído para uso como molde em ensaios de PCR com primers direcionados para a região contendo o gene *I-7*, visando à amplificação de regiões com polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) capazes de gerar os marcadores CAPS. A avaliação para a resposta ao FOL raça 3 da população segregante F<sub>2</sub> resultante da autofecundação do híbrido 'BRS Imigrante' (heterozigoto *I-7* / *i-7*) revelou um ajuste adequado da característica de resistência a um modelo monogênico dominante como indicado pelos valores do teste de  $X^2$ -quadrado. O marcador CAPS derivado do alelo dominante *I-7* apresentou uma perfeita co-segregação com a característica de resistência, sendo capaz de diferenciar diretamente em gel de agarose as classes homozigotas e heterozigotas, possibilitando um processo de seleção mais rápido, preciso e eficiente. Desta forma, esse novo marcador CAPS pode ser útil nos programas de seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético do tomateiro visando resistência a todas as raças de FOL.

**Palavras-Chave:** Resistência, melhoramento genético, *Solanum lycopersicum*, patógenos de solo.

## **Development and validation of functional molecular markers to monitor *I-7* gene incorporation into tomato accessions.**

### **Abstract**

Genetic control has been one of the main tools that help in the sustainable management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), the causal agent of fusarium wilt, in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Currently, three physiological races of FOL are widely distributed in the world, which have been controlled by a diverse repertoire of resistance genes (*I*, *I-2*, *I-3*, and *I-7*). These resistance factors are able to suppress the attack against specific races of the pathogen. An exception is the *I-7* gene (located on chromosome 8) which has a mechanism of action that confers broad-spectrum resistance against all races of FOL. The *I-7* gene was recently cloned and is a representative of a new class of resistance genes. Even with all the availability of structural information and genomic positioning of the *I-7* gene, there are currently no validated functional and codominant markers capable of identifying its presence and allelic status in tomato accessions. These markers would represent important tools in the genotyping of plants in breeding programs. In this context, a functional, codominant CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) markers were developed and validated. For this purpose, an F<sub>2</sub> population segregating for the *I-7* gene was obtained and submitted to an inoculation test with five isolates of FOL race 3. After 21 days the plants were evaluated using a rating scale and submitted to statistical tests. Leaf samples from plants with and without symptoms were collected, and genomic DNA was extracted for use as a template in PCR assays with primers directed to the region encompassing the *I-7* gene, aiming at amplifying regions with single nucleotide polymorphisms (SNPs) capable of generating the CAPS markers. The evaluation for the response to FOL race 3 of the F<sub>2</sub> segregating population resulting from the selfing of the hybrid 'BRS Imigrante' (heterozygous *I-7* / *i-7*) revealed an adequate fit of the resistance trait to a dominant monogenic model as indicated by the values of the  $\chi^2$ -square test. The CAPS marker derived from the dominant *I-7* allele showed perfect co-segregation with the resistance trait, being able to directly differentiate homozygous from heterozygous classes on agarose gel, enabling a more accurate and efficient selection process. Thus, this new CAPS marker can be useful in selection programs assisted by molecular markers in tomato genetic improvement programs aiming at resistance to all FOL races.

**Keywords:** Resistance, breeding, *Solanum lycopersicum*, soil-borne pathogens.

## INTRODUÇÃO

Dentro da ampla variedade de espécies vegetais cultivadas e consumidas em todo o mundo, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) se insere no grupo das principais hortaliças em escala global, apresentando uma incontestável importância social e econômica (Bergougnoux, 2014). A produção mundial de tomate gira em torno de 180 milhões de toneladas ocupando uma área de pouco mais de 5 milhões de hectares em 2019. Nas últimas décadas a produção aumentou 66% e a área plantada 27% (FAOSTAT 2021).

No entanto, a cultura do tomateiro é afetada por mais de 200 doenças provocadas por fatores bióticos e abióticos, ocasionando perdas de produtividade, elevando o custo de produção das lavouras, afetando a sanidade e qualidade dos frutos em diversas regiões produtoras (Reis & Lopes 2012). As doenças de origem fúngica são de suma importância, podendo inviabilizar e/ou restringir o cultivo em algumas regiões ou épocas do ano, provocando perdas e elevando custo de produção (Reis & Lopes 2012). Dentre as principais doenças fúngicas que afetam a cultura do tomate, destaca-se a murcha de fusarium (MF), que afeta a planta em qualquer estágio de desenvolvimento e está presente em todas as regiões produtoras do mundo (Kurozawa & Pavan 2005). A MF é provocada por diferentes raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersisci* (FOL) que são capazes de induzir doença apenas em determinadas cultivares e acessos contendo genes de resistência específicos (Gonzalez-Cendales et al. 2016). A infecção de FOL se dá através da presença do fungo no solo, que, em contato com fissuras ou ferimentos nas raízes, provocando penetração e invasão do sistema radicular da hospedeira (Kuramae & Souza, 2008). Após a infecção ocorre a colonização dos vasos do xilema e produção de esporos na superfície da planta hospedeira. Os sintomas da doença nos estágios iniciais são amarelecimento, redução no crescimento que progride para murcha intensa nas horas mais quentes do dia e posterior escurecimento vascular intenso ocasionando a morte da planta. Os sintomas de murcha são resultantes da obstrução dos vasos do xilema devido a colonização das hifas do patógeno provocando acúmulo de géis, tilose e calose no sistema vascular da planta hospedeira (Houterman et al., 2007).

Desde o primeiro relato formal de FOL no meados da década de 1930 (Bohn & Tucker, 1939), distintas raças têm sido detectadas em praticamente todas as regiões produtoras de tomate no mundo (Alexander & Tucker, 1945, Grattidge & O'Brien, 1982, McGrath et al., 1987, Volin & Jones, 1982, Ureta et al., 1996, Reis et al., 2005, Gonçalves et al., 2021). Essa diversidade de variantes do patógeno e de genes de resistência da hospedeira transformou o patossistema tomate-

FOL em um modelo de estudos a nível molecular para outras interações entre planta hospedeiras e membros do complexo *F. oxysporum* (Michielse & Rep, 2009).

No patossistema tomate-FOL já foram descritas quatro raças, sendo três delas amplamente distribuídas. A distinção das raças é feita através de bioensaios que avaliam a capacidade de um determinado isolado de FOL infectar (ou não) um conjunto de acessos diferenciadores pertencentes ao gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*) contendo diferentes fatores de resistência. Estes fatores foram caracterizados e introgrididos ao longo dos anos em programas de melhoramento genéticos do tomateiro, visando a incorporação de resistência ao patógeno em variedades comerciais altamente produtivas (Gonzalez-Cendales et al., 2016). O primeiro gene de resistência à raça 1 de FOL foi introgridido do acesso *S. pimpinellifolium* L. ‘PI 79532’ (Paddock, 1950; Stall & Walter, 1965; Bohn & Tucker, 1939). Esse gene recebeu o símbolo *I* (= *Immunity*), estando localizado no cromossomo 11 (Paddock, 1950; Stall & Walter, 1965, Bohn & Tucker, 1939). No entanto, a durabilidade do gene *I* foi muito reduzida com o surgimento de isolados da raça 2 que se mostraram capazes de suplantar esse fator de resistência (Alexander & Tucker, 1945). Fontes de resistência foram detectadas contra isolados raça 2 e estudos de herança demonstraram a presença no acesso *S. pimpinellifolium* ‘PI 126915’ de um gene dominante que foi denominado de *I-2* (Stall & Walter, 1965). A região genômica do cromossomo 11 que contém o gene *I-2* apresenta também seis genes homólogos de membros da família de genes do resistência do tipo “nucleotide binding site leucine-rich repeats” (NBS-LRR) (Ori et al., 1997; Simons et al., 1998). O gene *I-2* tem sido amplamente utilizado nos programas de melhoramento durante muitas décadas (Grattidge & O’Brien, 1982; Volin & Jones, 1982). No entanto, o surgimento de isolados da raça 3 de FOL capazes de suplantar a resistência genética conferida por *I-2* obrigou os programas de melhoramento a buscarem novas fontes de resistência efetivas contra essas novas variantes do patógeno (Grattidge & O’Brien, 1982; Volin & Jones, 1982). Esses trabalhos identificaram um novo gene de resistência (denominado gene *I-3*) que foi detectado no acesso *S. pennellii* ‘LA716’ (Scott & Jones, 1989). O gene *I-3* (localizado no cromossomo 7) foi mapeado e clonado, sendo o seu produto gênico uma proteína quinase semelhante ao receptor S que se mostrou efetiva contra isolados de FOL raças 2 e 3 (Catanzariti et al., 2015).

Mais recentemente, o gene *I-7* (oriundo do acesso *S. pennellii* ‘PI-414773’) foi mapeado no cromossomo 8 e codificou uma proteína rica no aminoácido leucina denominada proteína do tipo LRR (Lim et al., 2006; Gonzalez-Cendales et al., 2016). Os fatores de resistência da série *I* (= *Immunity*) do tomateiro são capazes de suprimir o ataque contra raças específicas do patógeno.

Neste aspecto, o gene *I-7* é uma exceção com a vantagem de possuir um mecanismo de ação que confere uma resistência de amplo espectro contra todas as três raças de FOL (Gonzalez-Cendales et al., 2016). Como mencionado, o gene *I-7* foi recentemente clonado e é representante de uma nova classe de genes de resistência (Gonzalez-Cendales et al., 2016).

O uso de cultivares resistentes é o método mais prático, econômico e ambientalmente sustentável para o controle de FOL. Marcadores moleculares podem auxiliar na incorporação em larga escala de genes de resistência de amplo espectro em materiais comerciais de tomateiro. Mesmo com toda a disponibilidade da informação estrutural e do posicionamento genômico do *I-7*, não existe, até o momento, marcadores funcionais e codominantes validados para identificar a presença bem como o estado alélico deste fator de resistência para uso em sistemas aplicados de seleção assistida no tomateiro. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um marcador molecular funcional do tipo CAPS (= ‘*cleaved amplified polymorphic sequence*’) capaz de monitorar a incorporação do gene *I-7* em cultivares elite dentro dos programas de melhoramento genético de tomateiro contra as diferentes raças de FOL.

## MATERIAL & MÉTODOS

**Obtenção de uma população segregante para o locus *I-7*** – O presente trabalho foi conduzido em casa de vegetação, assim como nos Laboratórios de Fitopatologia, Genômica e Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças. Para obtenção da população segregante utilizou-se sementes híbridas de BRS Imigrante semeadas em bandejas individuais com 128 células (uma semente por célula), preenchidas com substrato estéril (Plantmax<sup>®</sup>) e identificadas. Após trinta dias (plantas com vinte centímetros de altura) foram retiradas das bandejas cuidadosamente e transplantadas para vasos de 10 L previamente umedecidos (irrigados um dia anteriormente) contendo uma mistura autoclavada de 69,6 % de solo de barranco, 10 % de areia lavada, 10 % substrato comercial, 10 % de palha de arroz 0,1 % de calcário (CaCO<sub>3</sub>), 0,25 % de superfosfato simples [Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] e 0,055 % de sulfato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]. Após trinta dias do transplante as plantas iniciaram o florescimento, com auxílio de uma pinça os botões florais foram cobertos com papel alumínio para evitar polinização cruzada entre plantas. Os frutos autofecundados foram coletados e as sementes foram extraídas e identificadas.

**Preparo das mudas de tomates e inoculação** – As sementes de plantas F<sub>2</sub> segregantes originárias

da autofecundação do híbrido ‘BRS Imigrante’ foram semeadas com substrato estéril (Plantmax®) e identificadas. Após 20 dias do semeio (DAS) as plantas apresentarem dois primeiros pares de folhas verdadeiras totalmente abertas, foram retiradas das bandejas e posteriormente realizou-se a remoção da parte apical das raízes (cerca de dois cm) com auxílio de uma tesoura esterilizada previamente. Em seguida os sistemas radiculares foram mergulhados em suspensão de esporos  $1 \times 10^6$  conídios/mL por 5 minutos. Foram utilizados neste presente estudo seis isolados de FOL raça 3 oriundos dos Estados de GO, DF, MG, ES, SP e PE. Para os tratamentos controle foram utilizados a cultivar ‘Floradade’ (resistente às raças 1 e 2 / loci  $I + I-2$ , mas suscetível a raça 3) e um tratamento inoculado apenas com água destilada. Em seguida as plantas inoculadas foram transplantadas para vasos de 1,5 L previamente umedecidos (irrigados um dia anteriormente) contendo uma mistura autoclavada de solo descrito anteriormente. Após o transplântio das mudas, foram adicionados 5 mL da suspensão de conídios no colo de cada plântula correspondente a cada tratamento. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com oito tratamento e 24 repetições por tratamento. Após 21 dias da inoculação foi realizado a avaliação do experimento usando uma escala de notas variando de 1 a 5, adaptada de Santos (1999), sendo o **1** = plantas sem sintomas; **2** = plantas sem sintomas de amarelecimento ou murcha, mas apresentando escurecimento vascular; **3** = plantas apresentando início de amarelecimento foliar ou murcha associados a escurecimento vascular intenso; **4** = plantas com amarelecimento e necrose foliar associadas a murcha intensa e **5** = plantas mortas. Com base nas notas recebidas às plantas foram classificadas em resistentes ( $R \leq 3$ ) e suscetíveis ( $S > 3$ ). As plantas foram classificadas como suscetíveis somente quando os sintomas característicos da doença foram observados. Os dados resultantes da avaliação foram tabulados e submetidos a testes estatísticos de comparação de médias no programa R Studio.

**Análise de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e desenvolvimento de marcadores do tipo CAPS para o alelo  $I-7$**  – Após 21 dias de inoculação de FOL raça 3, foram coletadas amostras foliares de plantas apresentando sintomas da doença semelhante a suscetível (S) e plantas semelhante a resistente (R.) O marcador foi desenvolvido utilizando polimorfismos descritos em Gonzalez-Cendales et al. (2016). A **Figura 1** apresenta a região do cromossomo 8 da cultivar suscetível *S. lycopersicum* cultivar ‘Heinz’ (Genoma de referência da espécie) e os sítios dos primers e da região clivada pela enzima.

**Extração do DNA genômico das plantas inoculadas e análise de PCR utilizando marcador**

**CAPS projetados** – Após 21 dias foi realizado a coleta de amostras foliares das plantas inoculadas devidamente identificadas e armazenadas em freezer, a extração do DNA foi realizada através do método CTAB + solventes orgânicos com modificações (Boiteux et al., 1999). Após a extração a qualidade e quantidade do DNA foi ajustada através da visualização em gel de agarose 1,5 %. A caracterização molecular da presença do gene *I-7* nas amostras foi realizada através de teste de PCR, utilizando marcador de sequência polimórfica amplificada clivada (CAPS) projetados para gene *I-7* encontrado no cromossomo 8. As reações de amplificação (PCR) da região introgridida foram compostas de 3 µL de DNA genômico (20 ng/ µL), 2 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2 µL de dNTPs (2,5 mM cada), 0,32 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ l), 0,5+0,25+0,25 µL de cada primer, 10,48 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q com volume total de 20 µL. Para a PCR foi realizado um ciclo inicial de 95 °C por 1 minuto para a desnaturação do DNA seguido de 35 ciclos de PCR, com um ciclo inicial de 95 °C por 1 minuto para a desnaturação, 95 °C por 30 segundos para anelamento, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto de alongação. Adicionou-se um ciclo final a 72 °C por 7 minutos e armazenamento a 4 °C. Os produtos de PCR foram submetidos a digestão adicionando-se 2,5 µL de tampão “B”, 2,3 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 0,1 µL da enzima de restrição *SpeI* (New England Biolabs), somando um volume total de 25 µL. O produto de PCR com a enzima de restrição foi colocado no termociclador e submetido a temperatura 37 °C por 1 hora e analisados em géis de agarose (1,5 %) corados com corante UniSafe™ (Uniscience) e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador. Foi utilizado 5 µL do marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen) para estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA em gel.

## RESULTADOS

**Avaliação da população F<sub>2</sub> segregante para o gene *I-7* com isolados de FOL raça 3** – Foram obtidas a partir do híbrido BRS Imigrante (Embrapa Hortaliças, 2014) uma população F<sub>2</sub> apresentando diversidade de característica a resistência a FOL raça 3, segregando para o locus *I-7* (**Figura 2**). Neste estudo foi utilizado como controle suscetível a cultivar Floradade que apresenta resistência às raças 1 e 2. Neste trabalho também foi utilizado como controle a cultivar Floradade inoculada apenas com água. Todos os isolados obtidos nas diferentes regiões produtoras de tomate (DF, ES, GO, MG, PE e SP) foram patogênicos (Tratamento T1) quando inoculados na cultivar ‘Floradade’, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. O tratamento T6 inoculado com Fus 326 apresentou média inferior aos demais tratamentos quando submetido ao teste de inoculação. O

experimento foi submetido a testes estatísticos de comparação de médias Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ) no programa R Studio (**Tabela 1**). Os isolados (60, 321, 425, 676 e 216) testados neste presente estudo não diferiram estaticamente entre si aquando inoculados na população segregante F<sub>2</sub> BRS Imigrante (**Tabela 1**). A avaliação da população segregante do híbrido BRS Imigrante demonstra características com caráter monogênico dominante de resistência a FOL como indicado pelos valores do teste de qui-quadrado (**dados não apresentados**).

**Validação do marcador molecular do tipo CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*) para monitoramento dos loci de resistência** – Foi selecionado da população F<sub>2</sub> inoculada com FOL raça 3, plantas apresentando sintomas de ataque do patógeno e plantas sadias sem ausência de sintoma. Após uma análise de 94 plantas F<sub>2</sub> (**Tabela 2**) oriundas da inoculação de FOL, 53 plantas resistentes homozigotas (*I-7/I-7*) apresentam dois amplicons após digestão pela enzima *SpeI* de aproximadamente 240 e 190 pb, 35 plantas resistentes heterozigotas (*I-7/i-7*) apresentam três amplicons de aproximadamente 430, 240 e 190 pb e seis plantas suscetíveis amostradas se mostraram homozigotas (*i-7/i-7*) apresentando um amplicon intacto de 430 pb (**Figura 2**) que representa a ausência de sítio de digestão pela enzima *SpeI*. O fragmento de 430 pb representa produtos de PCR onde não ocorre a clivagem e são resultantes de indivíduos homozigotos suscetíveis, caracterizando este marcador como do tipo codominante (**Figuras 1 e 2**), sendo capaz de distinguir indivíduos homozigotos resistentes, heterozigotos resistentes e indivíduos suscetíveis (**Figura 2, Tabela 2**). Indivíduos heterozigotos para o gene *I-7* apresentaram valores de média estatisticamente semelhantes entre si, com plantas sem sintomas, amarelecimento foliar leve e poucas/ou nenhuma necrose radicular e caulinar. O tratamento controle inoculado apenas com água apresentou valores de médias semelhantes estatisticamente com o acesso ‘BRS Imigrante’.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizado um trabalho de desenvolvimento e avaliação de marcador molecular para o gene de resistência *I-7*. Foi feita a autofecundação do híbrido BRS Imigrante com o objetivo de se obter uma população F<sub>2</sub> segregante para o loco *I-7* de resistência. Posteriormente as sementes F<sub>2</sub> foram semeadas e realizado um experimento de inoculação com seis isolados de FOL raça 3 e extração de DNA e validação do marcador.

Todos os isolados de FOL raça 3 obtidos nas diferentes regiões produtoras de tomate foram



patogênicos no tratamento controle suscetível, não havendo diferenças significativas de virulência entre os isolados. O comportamento do número de dias para aparecimento dos primeiros sintomas do patógeno também foi semelhante. Até o presente trabalho, não há estudos que correlaciona a virulência de FOL com a diversidade genética e genes que relaciona a virulência de isolados que infecta tomateiro nas diferentes regiões produtoras no Brasil, entretanto há um relato em que caracteres moleculares de FOL coletados em cinco regiões indianas foram relacionados a diversidade genética do patógeno (Nimaladevi et al., 2016). Os atuais estudos de variabilidade existente em *Fusarium* spp. são realizados através do uso de ferramentas moleculares como o polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (Wilson et al., 2004), DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (Williams et al., 1990) e restrições inter-simples de sequência (ISSRs) (Guleira et al., 2007). O isolado Fus-326 apresentou média de agressividade inferior aos demais isolados, esta variação pode ocorrer devido à variabilidade genética do patógeno, sucessivos procedimentos de repicagem e temperatura na realização dos testes, variações de temperaturas diurnas e noturnas que afetam diretamente a virulência do isolado (Doohan et al., 2003; Boix-Ruíz et al., 2015).

A avaliação da população segregante do híbrido ‘BRS Imigrante’ inoculada com FOL raça 3 demonstrou, através dos valores de teste qui-quadrado, que a herança da resistência se ajusta a um modelo monogênico dominante como esperado para o locus *I-7*. Estudos realizados anteriormente (**Capítulo 3**) indicaram que plantas heterozigotas (contendo apenas uma única cópia do gene dominante *I-7*) já se mostra suficiente para que ocorra o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro e desencadeia reações de resistência contra o patógeno. De acordo com Gonzalez-Cendales et al. (2016), a existência de um repertório de genes de resistência diversificado contra apenas um patógeno é um fato pouco comum, uma vez que os genes de resistência, na maioria dos sistemas planta-patógeno, apresentam especificidade apenas contra um subgrupo de variantes do patógeno. Esta diversidade de fatores de resistência também é observada em *F. oxysporum* apresentando um repertório variado de genes relacionados a suprimir o sistema de defesa do hospedeiro, como exemplo o gene RFO1 responsável por codificar uma quinase semelhante ao receptor não LRR associada à parede celular, RFO2 que codifica uma proteína semelhante ao receptor LRR extracelular (LRR-RLP) e RFO3 que codifica um quinase semelhante ao receptor S (SRLK) (Diener e Ausubel, 2005; Shen & Diener, 2013; Cole & Diener, 2013).

O marcador desenvolvido para o gene *I-7* tem como principal objetivo discriminar genótipos de tomateiro por meio da identificação de presença ou ausência do gene de resistência *I-7* que

confere resistência aos isolados de FOL raça 3. O desenvolvimento de marcadores CAPS para regiões de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) e inclusão do processo digestão com enzimas de restrição, têm sido amplamente utilizado para aplicações em estudos genéticos em melhoramento na cultura do tomateiro (Chitwood-Brown et al., 2021). No presente estudo, uma análise de 94 plantas F<sub>2</sub> demonstrou uma perfeita correlação entre os dados do bioensaio com o padrão de bandas correspondentes aos alelos *I-7* (resistente) e *i-7* (suscetível). A localização desse marcador codominante dentro da região codante permite selecionar plantas puras para essa característica e permite eliminar eventuais “escapes”, sendo as principais vantagens associadas com marcadores moleculares “funcionais” (Dianese et al., 2010). O gene *I-7* representa uma importante classe de genes R que possui mecanismo de ação distinto que confere uma resistência de amplo espectro às raças de FOL (Gonzalez-Cendales et al., 2016). A determinação do estado alélico desse gene em populações segregantes de interesse em programa de melhoramento genético para resistência a doenças, envolve, necessariamente, uma triagem mais extensa de testes de progênies (Staniaszek et al., 2007). A seleção de genótipos candidatos para programa de melhoramento genético, assistida por marcadores moleculares constitui de uma importante ferramenta que reduz a dependência de testes demorados de patogenicidade, facilitando identificar a presença de genes de resistência em populações.

## CONCLUSÕES

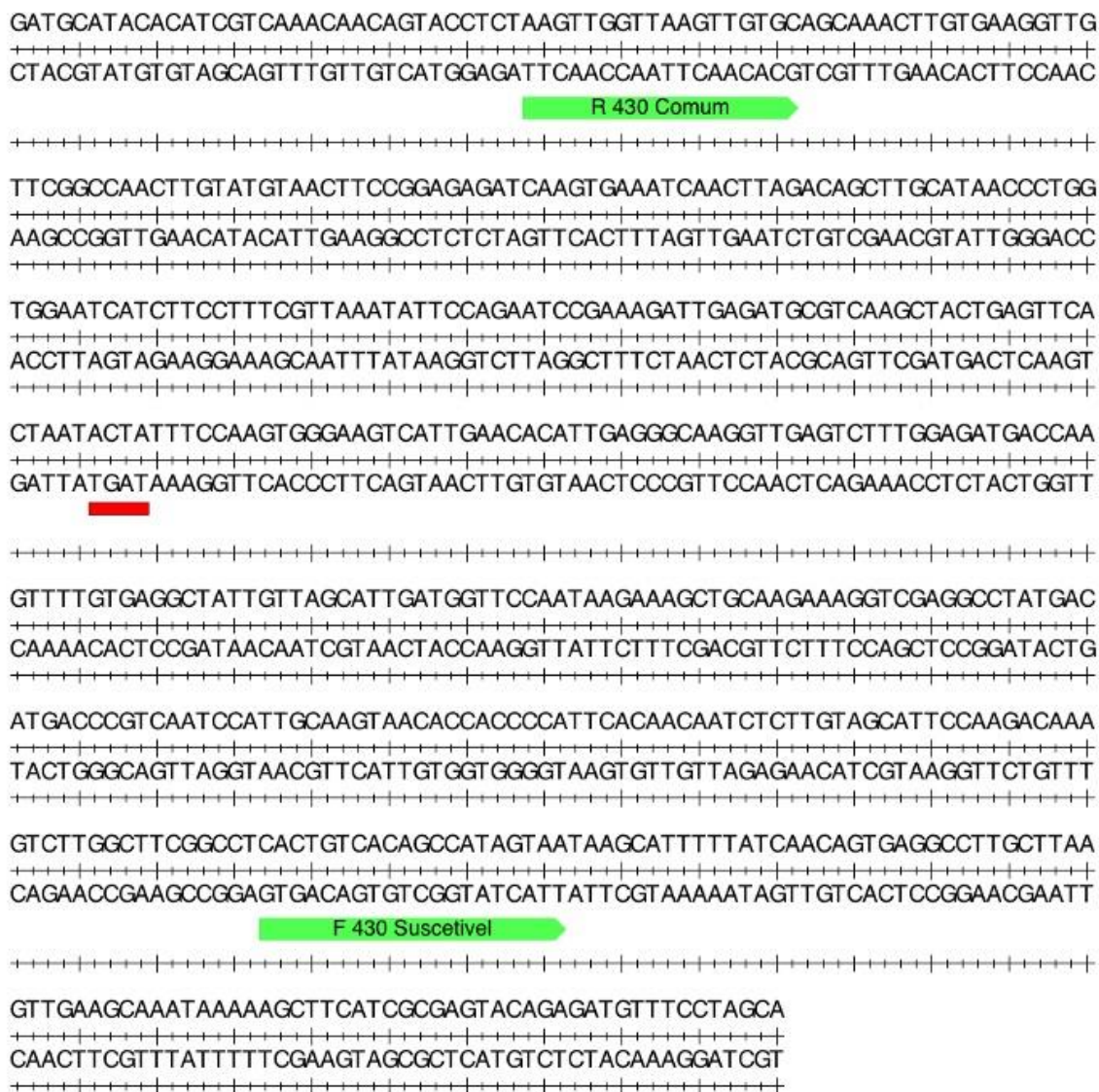
- A avaliação da população segregante F<sub>2</sub> do híbrido BRS Imigrante inoculados com FOL raça 3 demonstra que o gene *I-7* apresenta características com caráter monogênico dominante de resistência a FOL raça 3 como indicado pelos valores do teste de Qui-quadrado.
- O marcador CAPS *I-7* codominante foi capaz de diferenciar diretamente as classes homozigotas e heterozigotas em populações F<sub>2</sub>, possibilitando um processo de seleção de plantas resistentes a FOL de forma mais precisa em comparação com a seleção fenotípica através de testes de patogenicidade em populações segregantes.
- A localização desse marcador codominante dentro da região codante permite selecionar plantas puras para essa característica sem a necessidade de testes de progênies e permite eliminar eventuais “escapes”, sendo as principais vantagens associadas com marcadores moleculares “funcionais”.
- Esta ferramenta também facilita o processo de piramidização de genes de resistência que proporciona maior durabilidade da resistência do hospedeiro em campo.

## REFERÊNCIAS

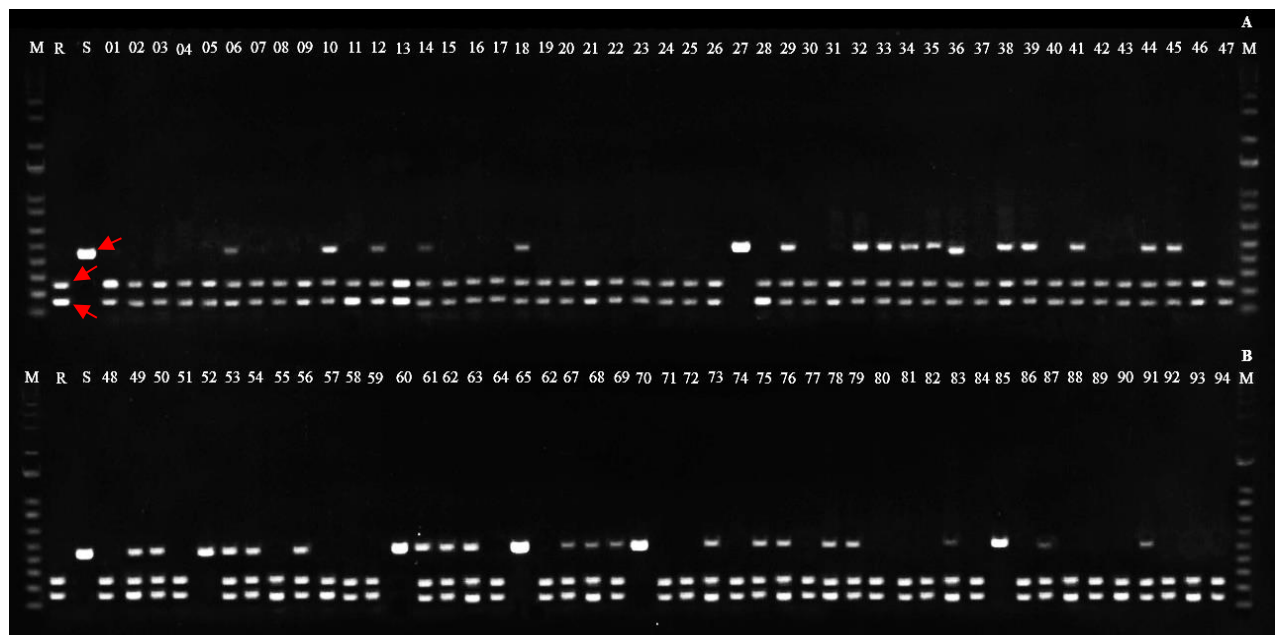
- ALEXANDER LJ, TUCKER CM (1945). Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Agricultural Research, 70 (9), 303–313.
- BERGOUGNOUX V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. Biotechnology Advances, 32(1), 170–189.
- BOHN GW, TUCKER CM (1939). Immunity to *Fusarium* wilt in the tomato. Science, 89(2322), 603-604.
- BOITEUX LS, FONSECA MEN, SIMON PW (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota* L.). Journal of the American Society for Horticultural Science 124, 32–38.
- BOIX-RUIZ A, GÁLVEZ-PATÓN L, DE CARA-GARCÍA M, PALMERO-LLAMAS D, CAMACHO-FERRE F, TELLO-MARQUINA, JC (2015). Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Phytoparasitica, 43(4), 471–483.
- CATANZARITI AM, LIM GT, JONES DA (2015). The tomato *I-3* gene: A novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. New Phytologist, 207(1), 106–118.
- CHITWOOD-BROWN J, VALLAD GE, LEE TG, HUTTON SF (2021). Breeding for resistance to *Fusarium* wilt of tomato: A review. Genes, 12(11), 1673.
- COLE SJ, DIENER AC (2013). Diversity in receptor-like kinase genes is a major determinant of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthioli*. New Phytologist, 200(1), 172–184.
- DIENER AC, AUSUBEL FM (2005). *Resistance to fusarium oxysporum 1*, a dominant Arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. Genetics, 171(1), 305–321.
- DIANESE EC, FONSECA MEN, GOLDBACH R, KORMELINK R, INOUE-NAGATA AK, RESENDE RO, BOITEUX LS (2010). Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. Molecular Breeding, 25, 133–142.
- DOOHAN FM, BRENNAM J, COOKE BM (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. European Journal of Plant Pathology, 109(1), 755–768.
- EMBRAPA HORTALIÇAS (2014) Cultivares da Embrapa Hortaliças (1981-2013). Brasília, DF: Embrapa, 80-81.
- FAOSTAT (2021). Banco de dados estatísticos corporativos da Food and Agriculture Organization. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 03 de junho, 2023.
- GONÇALVES AM, CABRAL CS, REIS A, FONSECA MEN, COSTA H, RIBEIRO F H S,

- BOITEUX LS (2021) A three-decade survey of Brazilian *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races assessed by pathogenicity tests on differential tomato accessions and by molecular markers. *Journal of Applied Microbiology*, 131: 873–884.
- GONZALEZ-CENDALES Y, CATANZARITI AM, BAKER B, MCGRATH DJ, JONES DA (2016). Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 448–463.
- GRATTIDGE R, O'BRIEN RG (1982). Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease*, 66(2), 165–166.
- GULERIA S, AGGARWAL R, THIND TS, SHARMA TR. (2007). Morphological and pathological variability in rice isolates of *Rhizoctonia solani* and molecular analysis of their genetic variability. *Journal of Phytopathology*, 155(11-12), 654–661.
- HOUTERMAN PM, SPEIJER D, DEKKER HL, KOSTER CG, CORNELISSEN BJC, REP M (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Molecular Plant Pathology* 8: 215–221.
- KURAMAE EE, SOUZA NL (2008). Variabilidade genética entre formaes speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. *Acta Scientiarum* 24: 1481–1485.
- KUROZAWA C; PAVAN MA (2005) Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI H; AMORIM L; REZENDE JMA; BERGAMIN FILHO A; CAMARGO LEA. (Eds). *Manual de Fitopatologia*. Vol 2. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres.
- LIM GTT, WANG G-P, HEMMING MN, BASUKI S, MCGRATH DJ, CARROLL BJ, JONES DA (2006). Mapping the *I-3* gene for resistance to *Fusarium* wilt in tomato: Application of an *I-3* marker in tomato improvement and progress towards the cloning of *I-3*. *Australasian Plant Pathology* 35: 671–680.
- MCGRATH DJ (1988) *Fusarium* wilt resistant tomatoes. *Queensland Agricultural Journal* 114, 290.
- MICHELSE CB, REP M (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10:311–324.
- NIRMALADEVID, VENKATARAMANA M, SRIVASTAVA RK, UPPALAPATI SR, GUPTA VK, YLI-MATTILA T, CHANDRA NS (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific reports*, 6(1), 21367.
- ORI N, ESHED Y, PARAN I, PRESTING G, AVIV D, TANKSLEY S, FLUHR R (1997). The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *The Plant Cell*, 9(4), 521–532.
- PADDOCK EF (1950). A tentative assignment of the *Fusarium*-immunity locus to linkage group 5 in tomato. *Genetics*, 35: 683–684.

- REIS A, COSTA H, BOITEUX LS, LOPES CA (2005) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 30: 426–428.
- REIS A, LOPES CA (2012). Doenças caudadas por fungos e distúrbios fisiológicos. Produção de tomate para processamento industrial 179–202.
- SANTOS JRM (1999). Protocolo de Tecnologia: Tomateiro/ Murcha de fusário (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Comunicado Técnico, N o 11. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças 4pp.
- SCOTT JW, JONES JP (1989). Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. *Euphytica*, 40(1), 49–53.
- SHEN Y, DIENER AC (2013). *Arabidopsis thaliana* resistance to *Fusarium oxysporum* 2 implicates tyrosine-sulfated peptide signaling in susceptibility and resistance to root infection. *PLoS genetics*, 9(5), e1003525.
- SIMONS G, GROENENDIJK J, WIJBRANDI J, REIJANS M, GROENEN J, DIERGAARDE P, VOS P (1998). Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *The Plant Cell*, 10(6), 1055–1068.
- STALL R E, WALTER JM (1965). Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of races 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology*, 55(11), 1213–1215.
- STANIASZEK M, KOZIK EU, MARCZEWSKI W (2007). A CAPS marker TAO1902 diagnostic for the *I-2* gene conferring resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 in tomato. *Plant Breeding*, 126(3), 331–333.
- VALENZUELA-URETA J, LAWN D, HEISEY RF, ZAMUDIO-GUZMAN V (1996) First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. *Plant Disease* 80, 105.
- VOLIN RB, JONES JP (1982). A new race of *Fusarium* wilt of tomato in Florida and sources of resistance. In: *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. p. 268-269.
- WILLIAMS JG, KUBELIK AR., LIVAK KJ., RAFALSKI JA, TINGEY S V (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.
- WILSON A, SIMPSON D, CHANDLER E, JENNINGS P, NICHOLSON P (2004). Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 233(1), 69–76.



**Figura 1** – Representação esquemática da região genômica contendo o alelo recessivo de suscetibilidade *i-7*: Cromossoma 8 iniciando no nucleotídeo 61.639.734 na montagem do genoma de referência Heinz 2.5. (Sol Genomics Network). Os “primers” representados são: R 430 Comum 5’-AAG TTG GTT AAG TTG TGC-3’; e F 430 suscetível (5’-TTA CTA TGG **CTG TGA** CAG TG-3’). O “primer” F 430 resistente (5’-GCT TAC **GAC TGT GAA** AAC-3’) não está representado na figura. Os nucleotídeos sublinhados e em negrito são comuns aos dois “primers”. A região de corte da enzima *SpeI* (**TGATCA**) é indicada. No entanto, no alelo suscetível a região tem a sequência alternativa **TGATAA** que não é clivada pela enzima *SpeI*, permanecendo o amplicon de 450 pares de base intacto.



**Figura 2** – Géis de agarose (1,5 %) ilustrando os padrões de restrição do marcador CAPS *I-7* amplificados na população  $F_2$  segregante para o gene *I-7* (linhas de corrida entre 1 e 94), onde os produtos de restrição específicos são indicados por setas vermelhas. **M** = Marcador 1Kb Plus. **R** = homocigoto resistente. **S** = homocigoto suscetível. Plantas individuais heterocigotas (*I-7/i-7*) apresentam todas as três bandas (exemplo: do indivíduo 32 até o indivíduo 36).





**Figura 3** – Ensaio de patogenicidade plantas em população  $F_2$  de tomateiro portadoras do gene *I-7* inoculadas com FOL raça 3. (R) Plantas controle resistentes BHRS-2,3 (homozigoto). (S) Plantas controle suscetíveis Floradade (homozigoto). As fotos foram tiradas 20 dias após a inoculação. Após 18 dias as plantas foram coletadas e extraídas o DNA para análise. As plantas 27, 65, 70 e 85 apresentaram um fragmento de amplicom característicos de homozigoto suscetível. As plantas 01, 02, 28, 37, 40, 42, 47, 48, 57, 58, 66, 86 e 92 apresentaram dois padrões de fragmento de amplicom característicos de homozigoto resistente. As plantas 35, 36, 38, 39, 41, 49, 50, 69 e 91 apresentaram três padrões de fragmento de amplicom característicos de heterozigoto resistente. Os dados de avaliação dos sintomas da doença aos 21 dias foram os mesmos encontrados para os homozigotos (*I-7/I-7*) e heterozigotos (*I-7/i-7*) apresentaram perfil de resistência ao patógeno. Os homozigotos (*i-7/i-7*) foram suscetíveis ao patógeno, apresentando sintomas severos de amarelecimento e murcha.

**Tabela 1** – Avaliação da população F<sub>2</sub> segregante para o gene *I-7* contra diferentes isolados *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3, coletados em seis estados produtores.

Acessos de Tomateiro	Tratamento	Isolados de FOL raça 3*			
		Isolado	Estado	R	Média
Floradade	T1	FOL		+	3,61 a
F <sub>2</sub> BRS Imigrante	T2	Fus-060	GO	-	1,74 b
F <sub>2</sub> BRS Imigrante	T3	Fus-321	ES	-	1,66 b
F <sub>2</sub> BRS Imigrante	T4	Fus-425	SP	-	1,87 b
F <sub>2</sub> BRS Imigrante	T5	Fus-676	PE	-	1,75 b
F <sub>2</sub> BRS Imigrante	T6	Fus-326	MG	-	1,36 bc
F <sub>2</sub> BRS Imigrante	T7	Fus-216	DF	-	1,66 b
Floradade	T8	H <sub>2</sub> O		-	1,01 c
VC***					16,80%

\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05\%$ )

\*\*Coeficiente de Variação (%).

Agressividade (A)

Reação compatível (+)

Reação incompatível (-)

**Tabela 2** – Transcrição da análise do estado alélico do gene *I-7* de acordo com o resultado exibido no gel de agarose da **Figura 1**. Distribuição dos fragmentos de restrição do marcador CAPS em população F<sub>2</sub> segregantes para o *loci I-7* de tomateiro, inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3.

Indivíduos F <sub>2</sub>	Resposta a FOL Raça 3 e estado alélico do gene <i>I-7</i>	Fragmentos de restrição		
		A	B	C
Planta 01	R (homozigota)	-	+	+
Planta 02	R (homozigota)	-	+	+
Planta 03	R (homozigota)	-	+	+
Planta 04	R (homozigota)	-	+	+
Planta 05	R (homozigota)	-	+	+
Planta 06	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 07	R (homozigota)	-	+	+
Planta 08	R (homozigota)	-	+	+
Planta 09	R (homozigota)	-	+	+
Planta 10	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 11	R (homozigota)	-	+	+
Planta 12	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 13	R (homozigota)	-	+	+
Planta 14	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 15	R (homozigota)	-	+	+
Planta 16	R (homozigota)	-	+	+
Planta 17	R (homozigota)	-	+	+
Planta 18	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 19	R (homozigota)	-	+	+
Planta 20	R (homozigota)	-	+	+
Planta 21	R (homozigota)	-	+	+
Planta 22	R (homozigota)	-	+	+
Planta 23	R (homozigota)	-	+	+
Planta 24	R (homozigota)	-	+	+
Planta 25	R (homozigota)	-	+	+
Planta 26	R (homozigota)	-	+	+
Planta 27	S	+	-	-
Planta 28	R (homozigota)	-	+	+
Planta 29	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 30	R (homozigota)	-	+	+
Planta 31	R (homozigota)	-	+	+
Planta 32	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 33	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 34	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 35	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+

Planta 36	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 37	R (homozigota)	-	+	+
Planta 38	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 39	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 40	R (homozigota)	-	+	+
Planta 41	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 42	R (homozigota)	-	+	+
Planta 43	R (homozigota)	-	+	+
Planta 44	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 45	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 46	R (homozigota)	-	+	+
Planta 47	R (homozigota)	-	+	+
Planta 48	R (homozigota)	-	+	+
Planta 49	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 50	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 51	R (homozigota)	-	+	+
Planta 52	S	+	-	-
Planta 53	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 54	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 55	R (homozigota)	-	+	+
Planta 56	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 57	R (homozigota)	-	+	+
Planta 58	R (homozigota)	-	+	+
Planta 59	R (homozigota)	-	+	+
Planta 60	S	+	-	-
Planta 61	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 62	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 63	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 64	R (homozigota)	-	+	+
Planta 65	S	+	-	-
Planta 66	R (homozigota)	-	+	+
Planta 67	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 68	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 69	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 70	S	+	-	-
Planta 71	R (homozigota)	-	+	+
Planta 72	R (homozigota)	-	+	+
Planta 73	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 74	R (homozigota)	-	+	+
Planta 75	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 76	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 77	R (homozigota)	-	+	+

Planta 78	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 79	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 80	R (homozigota)	-	+	+
Planta 81	R (homozigota)	-	+	+
Planta 82	R (homozigota)	-	+	+
Planta 83	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 84	R (homozigota)	-	+	+
Planta 85	<b>S</b>	+	-	-
Planta 86	R (homozigota)	-	+	+
Planta 87	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 88	R (homozigota)	-	+	+
Planta 89	R (homozigota)	-	+	+
Planta 90	R (homozigota)	-	+	+
Planta 91	<b>R (heterozigota)</b>	+	+	+
Planta 92	R (homozigota)	-	+	+
Planta 93	R (homozigota)	-	+	+
Planta 94	R (homozigota)	-	+	+

(**A**) = fragmento de restrição de 450-400 pares de base (pb); (**B**) = fragmento de restrição de 250 pb; (**C**) = fragmentos de restrição de 190 pb. Códigos: (+) = presença de marcador; (-) = ausência de marcador; (R) = resistente; (S) = suscetível.

## **CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO**

- Ensaios de PCR realizados utilizando o conjunto de *primers* SIX1, SIX2, SIX3, SIX5, SIX6 e SIX7 com uma amostra representativa de isolados de FOL não se mostraram informativos na determinação das raças de FOL.
- Análise utilizando o *primer* SIX4 específico de raça 1 mostrou-se eficaz na caracterização de isolados brasileiros da raça 1, possibilitando a sua distinção dos isolados FOL raça 2.
- O emprego combinado do conjunto dos *primers* SIX4, Uni, Sp13 e Sp23 analisando em isolados brasileiros de FOL mostrou-se eficazes na caracterização molecular e distinção das raças, constituindo uma importante ferramenta molecular para uso rotineiro em laboratórios de Fitopatologia.
- Os isolados raça 3 de FOL foram todos virulentos quando inoculados no acesso Floradade promovendo uma interação de patogenicidade. Os acessos BHRS-2,3 (homozigoto *I-7/I-7*) e BRS Imigrante F<sub>1</sub> (*I-7/i-7*) apresentaram reação de resistência aos isolados de FOL raça 3, apresentando alta estabilidade genética do gene *I-7*. A presença de apenas uma única cópia do gene dominante é suficiente para codificação de proteína LRR-RLPs e desencadear a sinalização de defesa de amplo espectro contra patógenos de FOL.
- A avaliação da população segregante F<sub>2</sub> submetidos a teste de inoculação com FOL raça 3 revelou que a resistência conferida pelo gene *I-7* apresenta características com caráter monogênico dominante de resistência como indicado pelos valores do teste de  $\chi^2$ -quadrado.
- O marcador funcional CAPS desenvolvido para o gene *I-7* foi capaz de diferenciar as classes homozigotas e heterozigotas em populações F<sub>2</sub>, possibilitando seu uso em programas de seleção assistida por marcadores para seleção de plantas resistentes a FOL de forma mais precisa e confiável.
- O estudo e sequenciamento de genes de resistência apoia o desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais, que aceleram o desenvolvimento de cultivares de elite resistentes a FOL. Esses marcadores possibilitam a piramidização de genes em materiais comerciais que pode proporcionar um maior espectro e uma maior durabilidade da resistência da hospedeira contra o patógeno em condições naturais de campo.