

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

ESTIMATIVA DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACESSOS
CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE TOMATES (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) DO SUL DO BRASIL E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA
DO GENE Mi

BERNARDETE PRIMIERI CARELLI

SÃO CARLOS-SP, 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

ESTIMATIVA DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACESSOS
CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE TOMATES (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) DO SUL DO BRASIL E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA
DO GENE Mi

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, visando à obtenção do grau de doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

BERNARDETE PRIMIERI CARELLI

São Carlos-SP, 2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C271ev

Carelli, Bernardete Primieri.

Estimativa de variabilidade genética em acessos crioulos e cultivares comerciais de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) do sul do Brasil e avaliação da presença do Gene Mi / Bernardete Primieri Carelli. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

115 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Genética. 2. Polimorfismo (genética). 3. Tomate. 4. RAPD. 5. Variabilidade genética. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

Dedico esta tese ao meu esposo Antonio Carelli e ao meu filho
Fabrício Primieri Carelli.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos que tornaram possível a realização deste trabalho.

Em especial agradeço:

- Ao Dr. Lee Tseng Sheng Gerald, pela orientação e constante disposição em ajudar.
- Ao Dr. Sergio Echeverrigaray, pela orientação e ajuda durante todo o desenvolvimento do trabalho.
- À colega e amiga Luciana B. Andrade, pela amizade e estímulo nas horas mais difíceis.
- Ao colega Fábio Luís Maciel, pela amizade e contribuição direta na realização deste trabalho.
- Aos demais colegas e amigos que participaram em atividades ligadas a este trabalho.
- Ao programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar, que viabilizou a realização deste doutorado.
- A FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. ORIGEM E CENTRO DE DOMESTICAÇÃO DO TOMATE.	4
2.2. ASPECTOS BOTÂNICOS.....	5
2.3. MARCADORES MORFOLÓGICOS EM <i>Lycopersicon</i>	6
2.4. MARCADORES MOLECULARES EM <i>Lycopersicon</i>	7
2.4.1. MARCADORES PROTÉICOS.....	8
2.4.2. MARCADORES DE DNA EM <i>Lycopersicon</i>	10
2.4.3. MARCADORES RAPD.....	12
2.5. RESISTÊNCIA A NEMATÓIDES	14
2.5.1. GÊNERO MELOIDOGYNE.....	14
2.5.2. CARACTERIZAÇÃO DO GENE Mi POR PCR.....	15
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
3. AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE MORFOLÓGICA EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE TOMATES (<i>Lycopersicon esculentum</i> MILL.) DA REGIÃO SUL DO BRASIL.....	26
ABSTRACT.....	28
RESUMO.....	29

INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

4. ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DE SEMENTES EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE *Lycopersicon esculentum* MILL. DO SUL DO BRASIL 43

ABSTRACT.....	45
RESUMO.....	46
INTRODUÇÃO.....	47
MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

5. ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE *Lycopersicon esculentum* MILL. DO SUL DO BRASIL 59

ABSTRACT.....	61
RESUMO.....	62
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAIS E MÉTODOS.....	65

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
6. AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA À TRÊS ESPÉCIES DE <i>MELOIDOGYNE</i> (<i>M. javanica</i>, <i>M. arenaria</i>, <i>M. incognita</i>) E PRESENÇA DO GENE <i>Mi</i> EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE <i>Lycopersicon</i> <i>esculentum</i> MILL. DO SUL DO BRASIL	78
ABSTRACT.....	80
RESUMO.....	81
INTRODUÇÃO.....	82
MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
7. DISCUSSÃO GERAL.....	95
8. CONCLUSÃO.....	99

LISTA DE TABELAS

3. AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE MORFOLÓGICA EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE TOMATES (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) DA REGIÃO SUL DO BRASIL	
1. Os 35 acessos de tomates agrupados através de algumas características morfológicas dos frutos.....	34
2.A. Médias e desvios padrões dos principais descritores morfológicos dos frutos dos 35 acessos de tomate avaliados.....	36
2.B. (Continuação) Médias e desvios padrões dos descritores morfológicos combinados dois a dois dos 35 acessos de tomate.....	37
4. ESTIMATIVA DE VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DE SEMENTES EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill DO SUL DO BRASIL	
1. Lista dos trinta e cinco acessos de tomate (<i>L. esculentum</i>) utilizados neste estudo.....	50
5. ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. DO SUL DO BRASIL	
1. Lista dos trinta e cinco acessos de tomate (<i>L. esculentum</i>) utilizados neste estudo.....	66
2. Número total de <i>primers</i> utilizados, suas seqüências, número total de fragmentos, número de fragmentos monomórficos e polimórficos amplificados.....	68

6. AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A TRÊS ESPÉCIES DE MELOIDOGYNE (*M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita*) E PRESENÇA DO GENE Mi EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE *L. esculentum* Mill. DO SUL DO BRASIL

1.	Os 35 acessos de tomates <i>L. esculentum</i> incluídos neste trabalho.....	85
2.	Atribuição do grau e tipo de reação para cada sistema radicular.....	86
3.	Infestação de <i>Meloidogynes</i> (<i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> <i>M. arenaria</i>) aos 35 acessos de tomates.....	89
4.	Relação dos fragmentos amplificação dos genes Mi1.1 e Mi1.2 dos 35 acesos de tomate.....	91

LISTA DE FIGURAS

- 3. AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE MORFOLÓGICA EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE TOMATES (*Lycopersicon esculentum* Mill.) DA REGIÃO SUL DO BRASIL.**
- Diferentes frutos de alguns acessos dos tomates: 35 -(A), 27-(B), 18-(C), 31-(D), 29-(E), 34-(F), 20-(G), 25-(H), 30-(I), 33-(J), 32-(L), 24-(M), 17-(N), 18-(O), 14-(P), 15-(Q), 16-(R), 13-(S), 11-(T), 12-(U), 6-(a), 5-(b), 8-(c), 7-(d), 2-(e), 1-(f), 3-(g), 22-(V), 21-(X), 23-(Y), 9-(Z)..... 35
 - Dendrograma baseado nos descritores morfológicos entre os acessos de tomate construído por análise de agrupamento (UPGMA)..... 39
 - Distribuição dos 35 acessos de tomates com bases nas distâncias Euclidianas médias dos grupos Cerejas (1 ao 8), dos Corações de Boi (14, 15 e 16), dos Pimentões (9, 21, 22 e 23), dos Paulistas (18, 19, 25, 26, 28, 31, 32, 33, 35) e dos Gaúchos (10, 11, 12, 13, 17, 20, 24, 27, 29, 30, 34)..... 40
- 4. ESTIMATIVA DE VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DE SEMENTES EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE (*Lycopersicon esculentum* Mill) DO SUL DO BRASIL**
- Perfis eletroforéticos demonstrativos de proteínas de sementes de tomate. Setas indicam as 12 bandas selecionadas na ordem decrescente (1-12). Os nº 1 a 6 indicam o acesso de tomate. 1- Marmande, 2- Gaúcho, 3- cereja 2, 4 pimentão 3, 5-Cereja 8 e 6-Santa Clara..... 51
 - Dendrograma baseado na análise quantitativa dos perfis eletroforéticos de proteínas totais das sementes dos 37 acessos de tomates..... 53
 - Distribuição dos tomates comerciais e acessos crioulos de acordo com as funções canônicas discriminantes..... 55

5. ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE <i>Lycopersicon esculentum</i> MILL DO SUL DO BRASIL	
1. Gel de agarose demonstrativo com amplificação do <i>primer</i> OPX 15 com amostra dos 35 cultivares de tomate.....	69
2. Distribuição da frequência das bandas polimórficas entre os 35 acessos de tomate. Inserção permite comparação da distribuição entre cultivares comercial e acessos crioulos.....	71
3. Dendrograma baseado nos índices de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre genótipos de tomate construído por análise de agrupamento (UPGMA).....	72
4. Gráfico de distribuição com base nas funções discriminantes mostrando os 5 grupos concordando com a morfologia dos frutos: 1- tomate Gaúcho; 2- tomate Paulista; 3-tomate Coração-de-boi; 4-tomate Cereja; 5-tomate Pimentão.....	74
6. AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A TRÊS ESPÉCIES DE MELOIDOGYNE (<i>M. javanica</i>, <i>M. arenaria</i> e <i>M. incognita</i>) E PRESENÇA DO GENE <i>Mi</i> EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE <i>L. esculentum</i> Mill. DO SUL DO BRASIL	
1. A. Sistema radicular do cultivar Polka Baixo; B. Sistema Radicular do cultivar S.Cruz.....	90

RESUMO

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é uma das mais importantes hortaliças. Apesar, de ser nativo da região dos Andes, esta hortaliça foi oficialmente introduzida no Brasil pelos imigrantes europeus durante a última metade do século XIX. Hoje, variedades antigas e cultivares melhorados, são cultivados em diferentes regiões brasileiras. Nos últimos 20 anos, o Centro Ecológico de Ipê realizou um resgate das antigas variedades de tomate mantidas por pequenos agricultores da região Nordeste do Rio Grande do Sul. O presente trabalho teve como objetivo estimar o grau de variabilidade entre 35 acessos de tomate, 12 comerciais e 23 acessos crioulos, utilizando marcadores morfológicos e moleculares (protéicos e DNA), além de verificar a resistência e/ou susceptibilidade a *Meloidogynes* destes genótipos, bem como a presença do gene de resistência Mi através de PCR. A variabilidade morfológica dos frutos apresentada pelos acessos crioulos formou cinco grupos: os tipo Cereja, Pimentão, Coração de Boi, Gaúcho e Paulista, enquanto que os materiais comerciais restringiram-se aos grupos mais comuns no mercado, Gaúcho e Paulista. Os perfis eletroforéticos de proteínas totais solúveis de sementes mostraram a ocorrência de baixa variabilidade qualitativa, mas variações quantitativas permitiram a identificação de todos os materiais avaliados. A análise da variabilidade através de marcadores de RAPD permitiu a identificação de todos os genótipos avaliados, confirmando a eficiência deste tipo de marcadores na caracterização de materiais. A análise de agrupamentos permitiu a separação em sete grupos, os quais não apresentaram relação com aqueles formados com base nos perfis protéicos. Por outro lado, análise discriminante mostrou a existência de relação entre os marcadores de RAPD e os grupos de morfologia de fruto. De um modo geral, os materiais crioulos apresentaram maior variação nas proteínas de sementes e marcadores de RAPD o que pode ser tomado como indicativo de estreitamento da base genética nos materiais comerciais. Os

resultados obtidos no teste de resistência mostraram que todos os materiais crioulos e comerciais, com exceção dos cultivares Polka Baixo e Gaúcho (Feltrin) são suscetíveis a *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*. Considerando a alta incidência de *Meloidogyne* no Sul do Brasil, a baixa frequência de acessos resistentes, apontam a necessidade de um esforço especial na transferência dos genes de resistência aos nematóides das galhas da raiz para os acessos crioulos e cultivares do tomate comerciais do Brasil.

ABSTRACT

Cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is one of the most important horticultural crops. Although original from the Andes region, this crop was officially introduced in Brazil by the European immigrants during the last half of the XIX century. Today, old varieties and new improved cultivars are planted in the different Brazilian regions. In the last 20 years the Ecological Center of Ipê proceeded a rescue of old tomato varieties maintained by small agriculturists in the Northeast region of Rio Grande do Sul State. The present work had the objective to estimate the variability among 35 tomato accessions, 12 commercial cultivars and 23 Brazilian landraces using morphological descriptors and molecular traits (proteins and DNA), and to verify the *Meloidogyne* resistance/susceptibility status of these genotypes, as well as the presence of the Mi genes. The landraces were separate in five groups by their fruit characteristics: large oblate, cherry, heart-shape, large cylindrical, and rounded, whereas the commercial cultivars were restricted to the most common groups in the market. Both the quantitative evaluation of seed protein electrophoretic profiles, and RAPD markers allowed identifying all the accessions. The cluster analysis of RAPD data allowed to separate the genotypes in seven similarity groups that were not related with those formed by the protein analysis. Conversely, a discriminant analysis showed a relation between RAPD markers and fruit morphology. Landraces exhibited higher levels of protein and genetic (RAPD) variations compared with the commercial cultivars confirming the genetic variability reduction caused by the limited number of genotypes used in breeding programs. Experimental results showed that all the landraces and commercial cultivars, with the exception of the cultivars Polka Baixo and Gaucho (Feltrin) were susceptible to *M. javanica*, *M. incognita*, and *M. arenaria*. PCR data showed that the Mi1.2 gene was present only in the Polka Baixo cultivar, whereas the Mi1.1 was found in 26 accessions, most of which

susceptible to root-knot nematodes, confirming the gene Mi1.2 as the nematode resistant determinant, and the inefficiency of the Mi1.1. Considering the high incidence of *Meloidogyne* in South Brazil, the low frequency of resistant accessions point-out the necessity of a special effort of breeding programs on the transfer of root-knot nematode resistance genes to Brazilian tomato varieties and cultivars.

1. INTRODUÇÃO

O tomate cultivado (*Lycopersicon esculentum* Mill.) está entre as hortaliças mais consumidas no mundo, nas diferentes formas processadas ou “in natura”, é a segunda hortaliça em volume de produção mundial e ocupa o primeiro lugar na América Latina. De acordo com os dados da FAO (2001) o Brasil destaca-se entre os países da América do Sul, ocupando o primeiro lugar na produção e em área plantada, seguido de longe pelo Chile que produz menos que a metade da produção brasileira. No Brasil o tomate ocupa o segundo lugar em consumo dentro das hortaliças e são os estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo os principais produtores.

Apesar, do tomate ser oriundo da América do Sul, oficialmente sua introdução no Brasil é proveniente da Europa e data do século XIX. Foi durante o período da colonização, que diferentes variedades foram trazidas pelos imigrantes europeus e passaram a serem cultivados em varias regiões do país, constituindo-se em bancos de germoplasma brasileiro desta cultura. É provável também que algumas variedades de *cerasiforme*, tenham chegado ao Brasil trazidas pelos nativos durante seu deslocamento ao longo da América do Sul.

Provavelmente a fonte selvagem que deu origem ao tomate que conhecemos hoje, deve ter sido *Lycopersicon esculentum* variedade *cerasiforme*, que cresce espontaneamente em muitas regiões do mundo e apresentam ciclo anual com autopolinização e migração média, dispersando-se normalmente via pequenas populações sujeitas a diferentes forças de seleção.

Descrições e desenhos botânicos encontrados nos herbários europeus datam da metade para o final do século XVI. Esses documentos revelaram claramente que os primeiros tipos de tomates cultivados na Europa tinham frutos graúdos e uma ampla diversidade de formas e cores, indicando que o tomate alcançou um avançado estado de domesticação ainda na América.

O tomate é um exemplo clássico de espécie autógama cultivada, apresentando taxa de cruzamento natural de 1 a 3%, e que até a metade do século XX, teve sua fonte de germoplasma utilizada de forma inadequada para melhoramento da cultura e para o avanço genético básico. O extenso processo de melhoramento voltado apenas para características de interesse agrônômico, conquistou a um alto grau de uniformidade, envolvendo alguns genes em detrimento de outros, causando perda de variabilidade genética e tornando a cultura altamente vulnerável.

A cultura do tomateiro, é tida hoje, como uma das mais problemáticas em termos de pragas agrícolas, exigindo grandes investimentos em fitossanidade, conseqüente uma cultura altamente impactante. Uma situação muito particular diz respeito à incidência de nematóides formadores de galhas da raiz do gênero *Meloidogyne*. Estes fitoparasitas infectam o sistema radicular formando nódulos, impedindo a absorção de água e de nutrientes, são responsáveis por até 80% das perdas na produção agrícola. O controle destes fitoparasitas é realizado pelo uso de nematicidas, que com seu uso prolongado propicia um aumento de nematóides virulentos resistentes, como conseqüência, a inutilização de solos contaminados para tomaticultura. A situação tem se agravado também devido ao plantio da mesma cultura no mesmo local, contribuindo ainda mais para a proliferação destes fitoparasitas.

O controle de outras pragas e doenças comuns do tomateiro é realizado com aplicação indiscriminada de biocidas de largo espectro e com grandes períodos de carência o que eleva o custo da produção e aumenta a contaminação ambiental. Em contrapartida, manejos mais apropriados e práticas agrícolas auto-sustentáveis, com escolha de cultivares resistentes e melhor adaptados dentro de cada condição ambiental de produção, podem solucionar estes problemas e são passíveis de serem implantados. O Brasil caracteriza-se pelo alto índice de pequenas e médias propriedades de estrutura familiar responsáveis por aproximadamente 60% da produção de tomates.

Neste contexto, é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas que venham contribuir para a melhoria desta cultura de grande importância econômica mundial e materiais ainda pouco modificados como variedades antigas ou crioulas, podem ser fontes de recursos genéticos importantes que necessitam serem avaliados e preservados.

Este trabalho teve como objetivo estimar o grau de variabilidade dos acessos crioulos e dos cultivares comerciais de tomate (*Lycopersicon esculentum*) do Rio Grande do Sul, através dos marcadores Protéicos, marcadores RAPD, marcadores morfológicos, e verificar a resistência e/ou susceptibilidade a *Meloidogyne* e a presença do gene Mi através de PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ORIGEM E CENTRO DE DOMESTICAÇÃO DO TOMATE

O tomate é nativo da América do Sul, têm seu centro de origem na Região Andina, compreendendo um estreito território limitado ao sul pelo norte do Chile com latitude de 30°, ao norte pelo Equador e sul da Colômbia, ao leste pela Cordilheira dos Andes e ao oeste pelo Oceano Pacífico, incluindo o Arquipélago das Ilhas Galápagos (Rick, 1982).

O mais complexo tratamento dado a *Lycopersicon esculentum* credita a variedade *cerasiforme* como suposto ancestral do tomate cultivado no mundo todo. A hipótese mais comumente aceita de sua domesticação é que a variedade *cerasiforme* teria migrado do centro de origem Andina através do norte da América do Sul, cruzando o Istmo do Panamá e chegando até o sudoeste do México, na América Central. No México teria sido domesticada, levada para a Europa, adaptada e selecionada, disseminada para muitos locais do mundo (Jenkins, 1948; Rick, 1958), tornando-se fonte básica do germoplasma do tomate cultivado.

Entretanto, Rick & Fobes, (1975) e Rick & Holle, (1990), anos mais tarde formularam uma segunda hipótese de domesticação, em que centros independentes de domesticação podem ter ocorrido ao mesmo tempo, no México e na região Andina. Atualmente *cerasiforme* cresce espontaneamente em muitos locais da América do Sul, estando amplamente disseminado em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Rick, 1991), o que vem a corroborar com esta hipótese.

A domesticação das espécies de tomate ocorreu no México por tribos primitivas onde era conhecido por tomatl, na língua Nahuatl, e que sem dúvida, deu origem ao nome popular tomate (Rick, 1978; Esquinas-Alcazar, 1981). O documento mais antigo é uma ficha de herbário datada

de 1554, pelo botânico Píer Andrea Mattioli. Entre os primeiros tomates cultivados na Itália estava uma espécie com frutos amarelos, conhecidos popularmente, como “pomi d’oro”. No século XVIII, já era largamente consumido em vários países da Europa (Hille *et al.*, 1989). Entretanto, durante um longo período o tomate foi cultivado como planta ornamental, por ser considerado venenoso, a exemplo de outras solanáceas venenosas (Rick, 1958).

Estas primeiras populações melhoradas na Europa deram origem às chamadas “landraces” ou variedades “crioulas” de tomate que podem ainda conter muitos genes selvagens, tornando estas populações interessantes para estudos com finalidade de alargamento da base genética e o resgate da variabilidade perdida no processo de melhoramento desta espécie de importância econômica e ecológica no âmbito mundial (Saavedra *et al.*, 2001).

2.2. ASPECTOS BOTÂNICOS

O tomateiro é herbáceo, perene, mas cultivado como anual, de hábito de crescimento prostrado ou estendido e folhas compostas. A inflorescência é uma cimeira simples, bifurcada ou ramificada. O número de flores é variável. O fruto é uma baga de tamanho e formato variável. Internamente, os frutos podem ser bi, tri, tetra ou plurilocular. O fruto maduro pode ser vermelho, rosado ou amarelo.

O tomate cultivado é membro do gênero *Lycopersicon*, dentro da grande família das *Solanáceas*. Este gênero é relativamente pequeno, constituído por nove espécies. Estudos de relacionamento filogenético, baseados na capacidade de cruzamento e em características morfológicas separam estas espécies em dois grupos distintos denominados de: 1- complexo “*esculentum*”, formado por *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmani*, *L. hirsutum*, *L. pennellii*, *L. chmielewskii* e *L. parviflorum*; 2- complexo “*peruvianum*” formado por *L.*

peruvianum e *L. chilense*. Ambos os grupos apresentam alto grau de homossequenciamento em seus cromossomos, contendo uma inestimável fonte de variação genética (Rick, 1982).

O genoma do tomate quase sempre apresenta cópia única em um único locus ou número baixo de cópias com relativamente pouco DNA repetitivo e estão dispersos ao longo do genoma (Bernatzky & Tanksley, 1986; Zamir & Tanksley, 1988). Seu DNA é relativamente pequeno 0,74 pg (variam de 0,5pg a 200pg) (Miller & Tanksley, 1990).

2.3.MARCADORES MORFOLÓGICOS EM *Lycopersicon*

Os marcadores morfológicos, por serem simples e práticos, permanecem até hoje como sendo a ferramenta mais utilizada na identificação das plantas, mesmo que na sua grande maioria estejam ligados a características da planta adulta como flores, frutos e sementes (Hoyt, 1995). A avaliação de variabilidade genética em espécies selvagens e cultivadas por muito tempo foi estimada através da variabilidade morfológica (Rick, 1978).

A identificação é realizada através da morfologia externa da planta, os grupos resultantes devem ser reconhecidos visualmente. A identificação taxonômica oferece uma alternativa eficiente para organizar todas as informações sobre a espécie individualmente e o nome científico é a chave para se chegar a toda a informação publicada sobre a mesma. Por esta razão a aplicação de nomes corretos a planta é vital (Hoyt, 1995).

As características morfológicas envolvidas na identificação das espécies do gênero *Lycopersicon* são: tamanho da flor, tipo de inflorescência, formato da folha e hábito de crescimento, capacidade de cruzamento e caracteres dos frutos (Egashira *et al.*, 2000). São as características dos frutos que apresentam diferenças em uma grande variedade de caracteres

notáveis como forma, cor, tamanho, textura e número de carpelos, apresentando alta variabilidade morfológica (Rick, 1978; Rick *et al.*, 1990).

Atendendo as necessidades de mercado, as variedades de tomates cultivadas foram sendo modificadas até atingirem alto grau de uniformidade. Embora isto tenha contribuído para um produto desejável eles foram obtidos em despesa de variabilidade morfológica (Miller & Tanksley, 1990) e conseqüentemente de variabilidade genética (Rick, 1978). Neste processo as maiores perdas foram as das características como disseminação, toxidade e resistência a pragas e doenças que as plantas selvagens tinham adquirido ao longo dos tempos.

Hoje os marcadores morfológicos e os marcadores moleculares são utilizados como ferramentas que se complementam para avaliar variabilidade genética dentro de espécies cultivadas. A combinação de dados morfológicos com dados moleculares torna a avaliação mais completa e precisa (Rick & Yoder, 1988).

2.4. MARCADORES MOLECULARES EM *Lycopersicon*

Os marcadores moleculares podem ser definidos, segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de proteínas e isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma). Por ser o DNA a base da informação molecular, é natural que nos reportemos a ele quando o objetivo é decifrar a organização evolutiva da variabilidade e controlar sua adaptação em condições impostas pelo homem. Foi desta pesquisa que surgiram os marcadores moleculares.

A partir dos anos 60, uma série de marcadores ligados a produtos do DNA, passaram a serem utilizados, tais como isoenzimas, proteínas totais, proteínas específicas, que são de certa

forma, indicadores diretos da variação existente dentro do DNA. Posteriormente surgiram as técnicas de PCR baseadas em marcadores ligados diretamente aos fragmentos de DNA.

As metodologias disponíveis podem ser separadas em duas grandes categorias: a) métodos baseados em análises de restrição e; b) métodos baseados na amplificação do DNA. Na primeira categoria inclui-se a análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), esta técnica requer grandes quantidades de DNA e as análises são, em geral, demoradas e trabalhosas, o que tem limitado a sua aplicação, dando lugar a mapas de baixa resolução (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A outra categoria de análises, desenvolvida mais recentemente, utiliza a reação de polimerização em cadeia (PCR), para a amplificação de segmentos de DNA e visualização de polimorfismo (Mullis & Faloona, 1987). Exemplos destas técnicas são RAPD, SSR (microsatélite ou *Simple Sequence Repeat*), e AFLP. A utilidade dos diagnósticos baseados em marcadores moleculares é determinada em grande parte pela técnica utilizada para revelar polimorfismo.

2.4.1. MARCADORES PROTÉICOS

A estimativa de relacionamento filogenético e de variabilidade em plantas cultivadas foi por muito tempo avaliados pelo método convencional de análise morfológica. Entretanto, estas características podem ser fortemente influenciadas por fatores ambientais que se refletem na planta adulta (Wang *et al.*, 2000).

Da necessidade de se obter respostas mais rápidas e seguras, nos anos 70 surgiram os métodos bioquímicos baseados em análise de proteínas e isoenzimas. A confiabilidade do método bioquímico está no fato de ser as proteínas, um produto fisiologicamente estável e facilmente manuseado (Ladizinsky & Hymavitz, 1979; Crawford *et al.*, 1990). Métodos bioquímicos

passaram a serem usados como ferramenta de apoio para caracterizar variedades e avaliar variabilidade em muitas espécies selvagens e mais especificamente em espécies cultivadas. Eles foram utilizados com sucesso, em estudos, envolvendo a caracterização de espécies e *pools* gênicos, determinação de centros de domesticação e diversidade, em estudos evolutivos (na identificação de ancestrais selvagens) e em estimativas de diversidade e relacionamento genético (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Um método bioquímico amplamente utilizado, a análise eletroforética de proteínas de sementes, pode estabelecer relações genéticas entre espécies e entre genótipos dentro de espécies em inúmeros cultivares vegetais (Crawford *et al.*, 1990). Dados protéicos foram mais precisos na separação de grupos de afinidade entre 43 cultivares de arroz quando comparados com dados de caracteres morfológicos (Aliaga-Morrel *et al.*, 1987) e estimar o grau de relacionamento entre espécies cultivadas de arroz (Sarka & Bose, 1984), milho (Smith & Lester, 1980), sorgo (Shechter & de Wet, 1975), mandioca (Grattapaglia *et al.*, 1987), entre outros. Foram estabelecidos com sucesso, grupos de afinidade entre linhas comerciais próximas em feijão comum através de análise eletroforética de proteínas totais e proteínas ácidas das sementes (Echeverrigaray *et al.*, 1993), e cinco grupos de afinidade entre acessos antigos e comerciais de *Phaseolus vulgaris* do Rio Grande do Sul (Maciel *et al.*, 1999).

Em tomates, as pesquisas com isoenzimas foram iniciadas por Rick *et al.*, (1983) com o objetivo de estudar o relacionamento genético entre o tomate cultivado e as espécies selvagens na busca de informações sobre os centros de domesticação do tomate. Pequenas diferenças foram encontradas por Rick & Fobes (1974), entre populações de tomates oriundos do Peru e Equador quando comparadas com tomates oriundos de outros países da América do Sul e Central, apresentando baixa variabilidade isoenzimática.

Perfis protéicos de sementes foram usados para avaliar pureza de tomates híbridos (Rick e Fobes, 1974; Tanksley, 1979; Medina-Filho, 1980; Tanksley e Jones, 1981; van den Berg, 1990, 1991), para identificação de cultivares comerciais (Chakraborti & Chattopadhyay, 1992), para avaliação do grau de compatibilidade em espécies de *Lycopersicon peruvianum* (Bernatzkey, 1993), e em sua grande maioria para avaliação de resistência a doenças (Rick & Fobes, 1974; Medina-Filho & Stevam, 1980; Bolkan *et al.*, 1987).

A estreita variabilidade nas características protéicas e o número limitado de sistemas isoenzimáticos polimórficos em tomates, tornou estes marcadores insuficientes para discriminar todos os genótipos (cultivares e/ou landraces) ou para avaliar variabilidade genética das espécies cultivadas. Porém, com o surgimento dos marcadores moleculares ligados diretamente ao DNA, pequenas diferenças podem ser detectadas (Caetano-Anolles *et al.*, 1991), e com a vantagem de exigir apenas pequenas quantidades de tecido do indivíduo a ser avaliado.

2.4.2. MARCADORES DE DNA EM *Lycopersicon*

As técnicas de análise molecular baseadas diretamente em fragmentos do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A caracterização molecular de diversidade genética através de marcadores de DNA, tornou-se uma prática útil e necessária. Para tanto, polimorfismo de DNA tem sido utilizado para estimativas de similaridade e/ou distanciamento genético entre genótipos (Peteira *et al.*, 1999).

A variabilidade genética existente dentro e entre as espécies de plantas cultivadas está intimamente relacionada com sua domesticação. O tomate é uma entre muitas espécies autógamas cultivadas em que seu germoplasma foi severamente reduzido, primeiro durante sua

domesticação fora do centro de origem e segundo pelo melhoramento na Europa (Saavedra *et al.*, 2001).

Em sua grande maioria os estudos de diversidade genética em *Lycopersicon esculentum*, baseados em marcadores moleculares, apontam para a estreita base genética dos cultivares modernos (Miller & Tanksley, 1990; Egashira *et al.*, 2000; Saavedra *et al.*, 2001). Sua diversidade genética mostrou-se limitada logo nos primeiros estudos utilizando isoenzimas (Rick e Fobes, 1975) e posteriormente foi confirmada com o uso de marcadores de DNA através de RAPDs (Rojas *et al.*, 1994; Egashira *et al.*, 2000; Saavedra *et al.*, 2001); RFLPs (Miller & Tanksley, 1990); AFLPs (Saliba-Colombani *et al.*, 2000) e microsatélites (Rus-Kortekaas *et al.*, 1994; Smulders *et al.*, 1997; Saavedra *et al.*, 2001).

A utilização recorrente de genótipos possuidores de caracteres desejáveis contribuiu de forma direta para o estreitamento da base genética (Rick, 1983). Mesmo dentro de cultivares modernas em que foram introgrididas características de espécies selvagens, pouca diversidade genética pode ser observada (Miller & Tanksley, 1990).

Entretanto, ainda existe variedades pouco modificadas que apresentam considerável polimorfismo e são denominadas de variedades crioulas, distribuídas em muitas partes do mundo, incluindo o Brasil. Segundo os resultados obtidos por Villand *et al.*, (1998) em suas avaliações, genótipos da América do Sul e regiões contíguas, apresentaram maior variabilidade genética quando comparada com genótipos europeus e norte americanos.

Embora cultivares apresentem diferenças em uma variedade de características morfológicas como cor de fruto, textura, forma, tamanho, hábito de crescimento e resistência a pragas e doenças, mesmo que estas características sejam distintas, elas podem ser atribuídas a alguns poucos genes (Rick, 1978). Conseqüentemente, diferenças fenotípicas podem ocorrer com

frequência por pequena troca gênica resultando em baixo polimorfismo dos marcadores moleculares (Williams & St. Clair, 1993).

Os marcadores RAPD parecem ser os mais apropriados por gerar uma grande quantidade de fragmentos polimórficos distribuídos ao acaso e ao longo do genoma sem evidências de agrupamento em regiões específicas (Williams *et al.*, 1993; Foolad *et al.*, 1993). Também por não exigir uma tecnologia sofisticada ou informações preexistentes, estes tem sido utilizados com sucesso na estimativa de variabilidade genética em plantas cultivadas (Cansian & Echeverrigaray, 1999; Maciel *et al.*, 1999), e podem auxiliar na avaliação de cultivares crioulos.

2.4.3. MARCADORES RAPD

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, ao serem utilizados “primers” mais curtos e de seqüência arbitrária, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada. A tecnologia RAPD permitiu uma grande expansão da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores de RAPD têm a vantagem de requerer pequenas quantidades de DNA comparados com outras técnicas, são mais fáceis, sensíveis e não utilizam marcação radioativa, podem ser utilizados para a identificação rápida e eficiente de muitos polimorfismos, e como tais, apresentam enorme potencial na identificação de cultivares (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Podem facilitar e acelerar estudos de diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma, para localização de genes de interesse econômico

(Caetano -Annóles *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1990) e construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica (Hemmat *et al.*, 1994; Kubisiak *et al.*, 1995).

Em tomate, os marcadores RAPD tem sido utilizados na resolução de alguns problemas práticos, incluindo a caracterização e discriminação entre grandes quantidades de acessos mantidos em bancos de germoplasma e também para otimizar estratégias de conservação de recursos genéticos (Waugl & Powel, 1992).

Do mesmo modo, trabalhos envolvendo teste de determinação da pureza genética de sementes de tomate híbridos foram realizados com sucesso (Hashizume *et al.*, 1993; Rom *et al.*, 1995; Luan *et al.*, 1998), variabilidade e distanciamento genético entre materiais asiáticos, demonstrando sua alta eficiência em caracterizar genótipos das mais variadas origens (Matsui & Yoshida & Yoshida, 1998). Mapas de ligação em tomate, baseados em marcadores RAPD, também tem sido descritos (Weide *et al.*, 1993; Foolad *et al.*, 1993; Stevens *et al.*, 1996; Pillen *et al.*, 1996).

A identificação de polimorfismos genéticos intravarietais é outro bom exemplo das possibilidades de aplicação da técnica de RAPD em tomate. Villand *et al.*, (1998), encontraram mais polimorfismo em acessos Sul-americanos (equatorianos, peruanos e chilenos) em comparação com acessos do Velho Mundo. Williams & Clair, (1993), através de marcadores RAPD identificaram alelos específicos para cada um dos cinco grupos avaliados, cultivares antigos, cultivares modernos, cultivares sul-americanos regionais, um genótipo selvagem de *L. esculentum* var. *cerasiforme*, e dois de *L. cheesmanii*.

A variabilidade genética é muito baixa dentro dos tomates cultivados (Rick, 1990; Williams & Clair, 1993; Williams *et al.*, 1990; Villand *et al.*, 1998; Egashira *et al.*, 2000; Saavedra *et al.*, 2001), e materiais crioulos ainda pouco modificados podem apresentar grupos genicos de resistência (Williams & St Clair, 1993).

2.5. RESISTÊNCIA A NEMATÓIDES

2.5.1. GÊNERO MELOIDOGYNE

Os nematóides estão entre os animais multicelulares mais numerosos do mundo e são, provavelmente, uma das formas de vida mais antigas no planeta. Eles são endoparasitas obrigatórios de inúmeras espécies de hortaliças, frutíferas, plantas ornamentais e florestais, tanto em clima tropical, subtropical e temperado, podendo reduzir significativamente a produtividade e a qualidade dos produtos (Willianson, 1998). Praticamente, todas as espécies de plantas cultivadas são atacadas por algumas espécies de nematóides que são economicamente importantes e de ampla distribuição mundial (Tihohod, 1993).

A doença é caracterizada pela presença de pequenos nódulos no sistema radicular das plantas infectadas. Os sintomas incluem desnutrição, suscetibilidade a outras doenças e conseqüentemente baixa produção (Willianson, 1998). As perdas na produção podem chegar a altos índices sendo o grau do dano dependente, dentro outros fatores, da densidade populacional do nematóide (Charchar, 1995).

As espécies de nematóides formadores de nódulos, também conhecidas formadoras da galha da raiz, pertencem ao gênero *Meloidogynes*. Dentro das principais espécies encontra-se *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla*, que são predominantemente partenocarpicas (Lordello, 1981).

Embora os nematóides das galhas tenham uma série ampla de hospedeiros, muitas espécies de plantas apresentam resistência a estes fitoparasitas (Roberts, 1995). As plantas conhecidamente resistentes, apresentam um gene dominante que confere resistência. Variedades de tomates cultivados carregam o gene de resistência, contra três das mais importantes espécies

de nematóides das galhas da raiz: *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita*, desta última derivou o nome do gene de resistência: gene Mi (Roberts & Thomason, 1986). Entretanto o tomate, de um modo geral, é considerado um hospedeiro natural dos nematóides da galga da raiz (Hwang *et al.*, 2000).

Inicialmente, a determinação de resistência das culturas aos nematóides das galhas da raiz era avaliada no fenótipo a campo. Com a descoberta dos marcadores isoenzimáticos passou a ser através de marcadores de resistência ligados à enzima fosfatase ácida Asp-1 (Rick & Fobes, 1974), sendo um dos marcadores mais conhecidos. Mais recentemente passou a ser através dos marcadores de DNA como Rex-1 (Willianson *et al.*, 1994) e hoje através de fragmentos mais específicos dentro do próprio gene de resistência através de PCR (Hwang *et al.*, 2000).

2.5.2. CARACTERIZAÇÃO DO GENE Mi POR PCR

A resistência a nematóides das galhas da raiz foi originalmente identificada em acesso de tomate selvagem *L. peruvianum*, uma espécie que normalmente não cruza com o tomate cultivado *L. esculentum* e que é a fonte de muitas outras resistências. A história da introgressão do gene Mi indica que um único locus de uma planta híbrida entre *L. peruvianum* e *L. esculentum* foi a fonte de toda resistência em tomates modernos (Medina-Filho & Stevens, 1980). Este fato foi anterior a década de 40, onde um híbrido interespecífico foi recuperado com sucesso de embriões (Smith, 1944).

O gene Mi encontra-se numa extensa região do genoma do tomate resistente, de aproximadamente 52 Kbs do DNA, localizada no cromossomo 6 (Messagueur *et al.*, 1991). A proteína codificada pelo gene Mi contém 1257 aminoácidos e apresenta alta similaridade com outras proteínas que tem importante papel na resistência a outros patógenos (Willianson, 1998).

Este gene codifica um produto pertencente à família de proteínas caracterizadas pela presença de sítios de ligação ricos em leucina (Milligan *et al.*, 1998).

Inicialmente um gene foi seqüenciado (Vos *et al.*, 1998), mais recentemente foi descoberto que o gene Mi é um membro de uma família de genes. Desta família foram seqüenciados dois genes que apresentam seqüências similares e foram chamados de gene Mi 1.1 e Mi 1.2 (Willianson, 1998; Milligan *et al.*, 1998). Trabalhos recentes concluíram que o gene Mi 1.2 confere resistência completa a *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. incognita*. Que este fenótipo é transmitido à progênie e que se mantém estável (Milligan *et al.*, 1998), e que o gene Mi 1.2 também confere resistência a afídios em batatas (Rossi *et al.*, 1998).

Embora altamente efetivo, o gene Mi em algumas condições especiais, como em altas temperaturas no solo e na presença de isolados virulentos de campo, falha em conferir resistência. O uso de nematicidas pode levar a um aumento de nematóides virulentos resistentes e como consequência a inutilização de solos contaminados para a tomaticultura (Willianson, 1998).

Hoje no contexto nacional e internacional cresce a necessidade de medidas de controle não químico de pragas e doenças, e o gene Mi é um excelente exemplo de uso de resistência do hospedeiro para reduzir efetivamente a necessidade do uso de pesticidas (Medina-Filho e Tanksley, 1983).

No germoplasma de espécies selvagens foram encontradas novas fontes de resistência, quase todas em *L. peruvianum* (Vereniz & Roberts, 1996; Yaghobi *et al.*, 1995). Foram identificados aproximadamente oito genes independentes e dominantes que foram denominados e enumerados gene Mi 1.1 ao Mi 1.8 que provavelmente estão ligados a diferentes propriedades de resistência (Cap *et al.*, 1993; Vereniz & Roberts, 1996; Yaghobi *et al.*, 1995).

A busca de novas fontes de resistência em espécies selvagens e/ou espécies crioulas ainda pouco modificadas, conjuntamente com formas alternativas de manejo de solo utilizando

tecnologias limpas tem sido alvo de pesquisa no mundo todo. A estratégia de identificação do gene Mi via PCR, quando aliada aos modernos métodos de transferência gênica em plantas pode ser extremamente útil, considerando-se o volume significativo de perdas em lavouras comerciais decorrentes de infestações ocasionadas pelo ataque de nematóides.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliaga-Morrel, J. R., Culiáñez-Maciá, F. A., Clemente-Marin G., Primo-Yúfera, E., 1987. Differentiation of rice varieties by electrophoresis of embryo protein. *Theor Appl Genet* 74. 224-231.
- Berg, B.M. van den., 1990. Inbred testing of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) F1 varieties by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. *Electrophoresis*, 11, 824-829.
- Bernatzkey, R., 1993. Genetic Mapping and protein product diversity of the self-incompatibility locus in wild tomato (*L. Peruvianum*). *Biochemical Genetic*. 31:173-185.
- Bernatzkey B., Tanksley S. D., 1986. Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. *Mol Gen Genet* 203: 8-14.
- Bolkan, H. A., Williamson, V. M., Waters, C. M., 1987. Use of cellulose acetate electrophoresis as an alternative to starch gel electrophoresis for detecting root-knot nematode resistance in tomato. *Amer Phytop Soc.* 71 (11):1001-1003.
- Caetano-Annóles, G., Bassan, B.J., Gresshoff, P. M., 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/technology* 9:553-557
- Cansian, R. L.; Echeverrigaray, S., 1999. Discrimination among cultivars of cabbage using randomly amplified polymorphic DNA markers. *HortScience* (in press).
- Cap G. P., Roberts, P. A., Thomason I. J., 1993. Inheritance of heat-stable resistance to *Meloidogynes incognita* in *Lycopersicon peruvianum* and its relationship to gene Mi. *Theor Appl Genet* 85. 777-783.
- Charchar, J. M., 1995. *Meloidogyne* em Hortaliça. Rio Quente, GO. SBN/ONTA. P.149-153.

- Chakraborti, A.K., Das, A.K. and Chattopadhyay, N.C., 1992. Identification of some Indian tomato cultivars by polyacrilamide gel electrophoresis of seed proteins. *Seed Research*, 20, 10-13.
- Crawford, D. J., 1990. *Plant molecular systematic: Macromolecular approaches*. New York. John Wiley & Sons. pp. 30-50.
- Echeverrigaray, S., Carvalho, M. T. V., Pompeu, A. S., Derbyshire, E., 1993. Affinity grouping of closely related lines of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) through comparative electrophoresis of seed proteins. *Rev. Brasil. Genet.*, 16: 759-771.
- Egashira ,H., Ishihara, H., Takashina, T., Imanishi, S., 2000. Genetic diversity of the 'peruvianum-complex' (*Lycopersicon peruvianum* L. Mill. and *Lycopersicon chilense* Dun.) revealed by RAPD analysis. *Euphytica* 116:1, 23-31.
- Esquinas-Alcazar, J.T., 1981. *Genetic Resources of Tomatoes and wild relatives*. Rome. IBPCR. 56p.
- FAO., 20021 *Agriculture & food trade: value exports of tomatoes*. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org>.
- Ferreira M.E., Grattapaglia, D., 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª ed. Brasília. Embrapa-Cenargen, p. 220
- Foolad M. R., Jones R. A., Rodriguez, R. L., 1993. RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Reports*. 12: 293-297.
- Grattapaglia, E., Nasser, N. M. A. Dianese, J. C., 1987. Biosistemática de espécies brasileiras do gênero *Maniot* baseada em padrões de proteínas de sementes. *Ciênc. Cult.* 39:294-300.
- Hashizume T., Sato T. Hirai M., 1993. Determination of genetic purity of Hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorph DNA (RAPD). *J Breed* 43:367-375.

- Helentjaris, T., King, G., Slocum, M., Siedenstrang, C. and Wegman, S., 1985. Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their tools for applied plant breeding. *Plant Molecular Biology*, 5, 109-116.
- Hemmat, M. , Weeden, N. F., Manganaris, A. G., Lawson, D. M., 1994. Molecular marker linkage map for apple. *J. of Heredity* 85:4-11
- Hille, J., Koornneef, M., Ramanna, M. S. Zabel, P. 1989. Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. *Euphytic* 42:1-23
- Hoyt, E. 1995. *Conservação dos Parentes Silvestres das Plantas Cultivadas*. 53 p.
- Hwang, C. F., Bhakta, A. V., Truesdell, G. M., Pudlo, W. M., Willianson, V. M., 2000. Evidence for a Role of the N terminus and Leucine-Rich Repeat of the Mi Gene Product in Regulation of Localized Cell Death. *Plant Cell*. 12:1319-1329.
- Jenkins J. A., 1948. The origin of the cultivad tomato. *Econ. Bot.* 2: 379-392.
- Kubisiak , T. L., Nelson, C. D., Nance, W. L., Stine, M., 1995. RAPD linkage mapping in a longleaf pinex slash pine F1 family. *Theor Appl Genet* 90:1119-1127.
- Laemmlli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Ladizinsky, G., Hymawitz, T., 1979. Seed protein eletro phoresis in taxonomic and evolutionary studies-review. *Theor Appl Genet*. 54:145-151.
- Lordello, L.G. E., 1981. *Nematóides das plantas cultivadas*. São Paulo. Nobel, 314p.
- Luan , Y. S.; Su, K.; Li, H. T.; An, L. J.; He, M. Y., 1998. Purity determination of tomato hybrid by RAPD technique. *Acta Horticulturae Sinica* 25(3): 247-251
- Maciel, F.L., Gerald, L.T.S., Echeverrigaray, S., 1999. ariation in phaseolin and other soluble proteins among cultivars and landraces of common beans of south-Brazil.*J. Genet.& Breed*.53:149-154.

- Matsui, T.; Yoshida, Y., 1998. RAPD analysis of Bangladeshi and Japanese tomatoes. Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture Kagawa University 50(1): 33-40
- Medina-Filho, H.P., 1980. Linkage of Aps-1, Mi and other markers of chromosome 6. *Report of Tomato Genetic Cooperative*, 30, 26-28.
- Medina-Filho, H. P., Stevens, M. A., 1980. Tomato breeding for nematode resistance: Survey of resistant varieties for horticultural characteristic and genotype of acid phosphates. *Acta Hort.* 100: 383-393.
- Medina-Filho, H. P., Tanksley, S. D., 1983. Breeding for nematode resistance. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV. (eds) *Handbook of Plant cell culture vol. 1 Techniques for propagation and breeding*. MacMillan. New York, pp904-923.
- Messeguer R., Ganai M. W., Steffens J. C., Tanksley S. D., 1991. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation of the nuclear DNA. *Plant Mol Biol.* 16: 753-770.
- Miller, J.C., Tanksley, S.D., 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 437-448.
- Milligan, S. D.; Bodean, J.; Yaghoodi, J.; Kaloshiani, I.; Zabel, P.; Williamson, V. M., 1998. The root Knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant-Cell.* 10: 8 1307-1319
- Mullis, K. Faloona, F., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzimol.* 55:335-350
- Nevo, E., Beiles, A., Storch, N, Doll, H., Andersen, B., 1983. Microgeographic edaphic differentiation in hordein polymorphism of wild barley. *Theor. Appl. Genet.* 64, 123-132.
- Peteira, B., Fernandez, E., Garcia, P., Miranda, E., Leon, O., Miranda, I., 1999. A brief study of RAPDs markers repeatability in *Lycopersicon*. *Revista-de Proteccion-Vegetal.* 2: 75-79

- Pillen, K., Ganal, M. W., Tanksley, S. D., 1996. Construction of a high genetic map and YAC-contigs in the tomato Tm-2^a region. TAG 93(1-2): 228-233
- Rick C. M., 1958. The role of natural hybridization in the derivation of cultivated tomatoes of western South America. Econ. Bot. 12: 346-367.
- Rick, C.M., 1976. Tomato. In: Simmonds, N.W. (ed) Evolution of crop plants, Longman, London, pp 269-273.
- Rick., C. M., 1978. The tomato. Sci. Americ. 239 (6): 76-87.
- Rick C. M., 1982. The potencial of exotic germplasm for tomato improvement. In: Vasil IK, Scowcrot WR, Frey Hj (eds) Plant improvement and somatic cell genetcs. Acad Press, New York, pp 478-495.
- Rick C. M., 1983. Evolution of mating systems. Evidence from allozyme variation. In: Genetics new frontiers. Proc. XV Inter. Cong Genetics. Pp 215-221.
- Rick, C.M., 1991. Tomato paste: A concentrated review of genetic highlights form the beginning to the advent of molecular genetics. *Genetics*, 128: 1-5.
- Rick C. M., Forbes J.F., 1974. Association of an allozyme with nematode resistance. Report of Tomato Genetic Coop, pp. 24- 25.
- Rick, C. M., Holle M., 1990. Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. Econ. Bot. 44:69-78.
- Rick C.M., Laterrot H., Philouze J., 1990. A revised key for the *Lycopersicon* especies. Rep.Tom Genet Coop. 40:31.
- Rick C.M. and Yoder, J.I., 1988. Classical and molecular genetics of the tomate: highligths and prospects. Annu. Ver. Gen. 22:281-300.
- Roberts, P. A., 1995. Conceptual and pratical aspects of variability in root-knot nematode related host plant resistance. Annu. Ver. Phytopathol. 33:199-221.

- Roberst, P. A., Thomason, I J., 1986. Variability in reproduction of isolates of *Meloidogynes incognita* and *M. Javanica* on resistant tomato genotypes. *Plant Dis* 70: 547-551.
- Rojas, R., Corona, B., Rivas, J. D., 1994. RAPD y polimorfismo genetico. *Cultivo Tropicales*. 15 (1) 82-84.
- Rom M., Bar M., Rom A., Pilowsky M., Gidoni D., 1995. Purity control of F¹- Hybrid tomato cultivars by RAPD markers. *Plant Breeding*. 114: 188-190.
- Rossi, M., Goggin, F., Milligan, S. B., Kaloshian i., Ullman, D., Williamson, V. M., 1998. The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistnace agaisnt the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 9750-9754.
- Rus-Kortekaas, W., Smulders, M.J.M., Arens, P., Vosman, B., 1994. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 37: 375-381.
- Saavedra, G., Spoor, W, Harrier, L., 2001. Molecular markers and genetic base broadening in *Lycopersicon* spp. *Acta Hort*. 546: 503-507.
- Saliba-Colombani, V., Cousse, M., Gervais, L., Philouse, J., 2000. Efficiency of RFLP, RAPD, and markers for the construction map of the tomato genome. *Genome* 43: 29-40.
- Sarka, R., Bose, S., 1984. Eletrophoretic characterization of rice varieties usingle seed (salt soluble) proteins. *Theor Appl Genet* 68: 415-419.
- Shechter, Y., De Wet, J. M. J., 1975. Comparative electrophoresis and isozyme analysis of seed proteins from cultivated races of sorghum. *Am J Bot*. 62(3):254-261.
- Smith, J. S. C., Lester, R. N., 1980. Biochemical systematics and evolution of *Zea*, *Tripsacum* and related genera. *Econ. Bot*. 34(3):201-218.
- Smith P. G., 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc Am Soc Hort Sci* 44:413-416.

- Smulders, M. J. M., Bredemeijer, G., Rus- Kortekaas, W., 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet.* 97:264-272.
- Stevens, M. R.; Heiny, D. K.; Rhoads, D. D.; Griffiths, P. D.; Scott, J. W.; Kuo, C. G., 1996. A linkage map of the tomato spotted wilt virus resistance gene Sw-5 using near isogenic lines and an interespecific cross. *Acta Horticulturae* 431: 385-392.
- Tanksley, S.D., 1979. Linkage, chromosomal association and expression of Adh-1 and Pgm-2 in tomato. *Biochemical Genetics*, 13, 1159-1167.
- Tanksley, S.D. and Jones, R. A., 1981. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F1 hybrids of tomato. *Hort. Science*, 16, 179-181.
- Tihohod, D., 1993. *Nematologia Agrícola Aplicada*. 3° Ed. Lavras. ESAL p. 57-77.
- Trudgill L. D. (1991) Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology*. 29: 167-192.
- Veremis, J. C., Roberts P. A., 1996. Relationships between *Meloidogynes javanica* in the *Lycopersicon peruvianum* complex. *Theor. Appl. Genet.* 93: 894-901.
- Villand, J., Skroch, P.W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C.G., Niemhuis, J., 1998. Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Sci.* 38: 1339-1347.
- Vos, P., Simons, G., Jesse, T., Wijbrandi, J., Heinen, L., Hogers, R., Frijters, A., Groenendijk, J., Diergaarde, P., Reijans, M., Fierens-Onstenk, J., De Both, M., Peleman, J., Liharska, T., Hontelez, J., Zabeau, M. 1998. The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nat. Biotechnol.* 16 (13): 1365-1369.

- Wang, X.F., Knoblauch, R. and Leist, N., 2000. Varietal discrimination of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. *Seed Science and Technology*, 28, 521-526.
- Waugh, R., Powell, W., 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 6: 186-191.
- Weide, R., Wordragen, M. F., Lankhorst, R. K., Verkerk, R., Hanhart, C., Liharska, T., Pap, E., Stam, P., Zabel, P., Koornneef, M., Van Wordragen, M. F., 1993. Integration of the classical and molecular linkage map of tomato chromosome 6. *Genetics* 135(4): 1175-1186.
- Williams, C.E. and St. Clair, A.A., 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*. 36, 619-630.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. L., Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Willianson, V. M., Lambert, K. N., Kaloshian, I., 1994. Molecular biology of nematode resistance in tomato. *See Ref.* 40: 211-219.
- Willianson, V. M., 1998. Root-Knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology*. 36: 277-293.
- Yaghoobi, J., Kaloshian, I. Wen, Y., Willianson V. M., 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl Genet.* 91: 457-464.
- Zamir D., Tanksley S. D., 1988. Tomato genome is comprised largely of fast-evolving, low copy-number sequences. *Mol. Gen. Genet.* 213:254-261.

3. AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE MORFOLÓGICA EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE TOMATES (*Lycopersicon esculentum* Mill.) DA REGIÃO SUL DO BRASIL.

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE MORFOLÓGICA EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE TOMATES (*Lycopersicon esculentum* Mill.) DA REGIÃO SUL DO BRASIL.

Bernardete Primieri Carelli¹, Lee Tseng Sheng Gerald¹, Sergio Echeverrigaray²

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Via Anhanguera, Km 174, Caixa Postal 153, Araras SP, Brasil.

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, Caxias do Sul, 95001-970, RS Brasil.

ABSTRACT

Thirty five tomato accessions, including 12 commercial cultivars and 23 landraces from South Brazil, were evaluated for ten morphological and agronomical traits. Considering fruit shape and size characteristics the 35 tomato accessions were separated in five groups: large oblate, cherry, heart-shape, large cylindrical, and rounded, that were confirmed by the cluster analysis based on the 10 traits examined. Among these groups, “Cherry” tomato accessions exhibited the largest variation for fruit shape, weight, color, and productivity. The morphological characteristics and productivity exhibited by some landraces support their potential use in commercial production and breeding programs.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*, morphological traits, tomato landraces, variability,

RESUMO

Trinta e cinco acessos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), incluindo 12 cultivares comerciais e 23 acessos crioulos do Sul do Brasil, foram avaliados a campo utilizando-se dez caracteres morfológicos e/ou agronômicos. Considerando a forma e tamanho dos frutos, os 35 acessos foram separados em cinco grupos: Gaúcho, Cereja, Coração de Boi, Pimentão e Paulista, os quais foram confirmados pela análise de agrupamento baseado nos dez descritores utilizados. Entre estes grupos, os acessos de tomate Cereja mostraram a maior variabilidade para forma, peso, cor e produção. As características morfológicas e a produção apresentada por alguns materiais crioulos demonstram o seu potencial para produção comercial e inclusão em programas de melhoramento.

Palavras chave: acessos crioulos, descritores morfológicos, *Lycopersicon esculentum*, variabilidade.

INTRODUÇÃO

Os caracteres morfológicos são os marcadores mais antigos e mais amplamente difundidos, por serem simples e práticos, permanecem até hoje, como sendo a ferramenta mais utilizada para identificação de plantas. A forma mais eficiente para organizar todas as informações sobre as espécies individualmente é através da Sistemática Vegetal e o uso do nome científico é a chave para se chegar a toda a informação publicada sobre a mesma em qualquer parte do mundo (Hoyt, 1995).

A avaliação de variabilidade genética em espécies selvagens e cultivadas de tomates por muito tempo foi estimada através da variabilidade morfológica (Rick, 1978; Rick, 1983). Nos últimos anos com o surgimento dos marcadores moleculares, a avaliação de caracteres morfológicos tem perdido espaço na avaliação de variabilidade genética (Rick, 1987). Mesmo assim, apesar das dificuldades operacionais e da influência ambiental, estes descritores continuam a serem utilizados devido à importância agronômica dos mesmos.

As principais características morfológicas utilizadas na identificação das espécies do gênero *Lycopersicon* são capacidade de cruzamento, hábito de crescimento, formato das folhas e tipos de flores e de frutos (Rick *et al.*, 1990; Egashira *et al.*, 2000). Para a caracterização dos cultivares comerciais, pertencentes a *L. esculentum*, os descritores mais utilizados são aqueles relacionados com a morfologia interna e externa dos frutos (Egashira *et al.*, 2000).

Segundo, Melo (1989), através de levantamento em fichas de herbários, os primeiros tipos de tomates levados para a Europa e cultivados naquela época apresentavam frutos graúdos e uma ampla diversidade de forma e cor. Entretanto, os cultivares comerciais atuais apresentam grande uniformidade de forma e cor, decorrente da seleção e melhoramento de tomate no sentido de atender preferências e demandas mercadológicas.

Hoje, na região da Serra Gaúcha, o tomate cultivado pode ser separado em dois grupos: um formado por materiais antigos ou crioulos mantidos por pequenos agricultores, os quais vem sendo mantidos no banco de germoplasma do Centro Ecológico de Ipê, consolidado através de mais de 20 anos de coleta e resgate de sementes na região nordeste do Rio Grande do Sul, e o outro por cultivares e híbridos comercializados por companhias de semente e importadores.

A avaliação de cultivares sob as mesmas condições edafoclimáticas permite comparar genótipos quanto ao seu potencial de produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças e pragas, o que possibilita conhecer os materiais mais adequados para cada região (Peixoto *et al.*, 1999).

A falta de informação e caracterização dos materiais do grupo crioulo, e a sua crescente importância econômica associada a agricultura ecológica, foi o principal impulso para a realização deste levantamento tendo como objetivo avaliar e caracterizar os acessos crioulos e cultivares comerciais através de marcadores morfológicos de frutos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico. No presente trabalho foram utilizados 35 acessos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), sendo 23 acessos crioulos oriundos do banco de germoplasma do Centro Ecológico de Ipê e 12 cultivares comerciais doadas pelas empresas Feltrin e ISLA, os mais cultivados nesta região (Tabela 1).

Produção de mudas de tomate. As sementes das 35 cultivares foram germinadas em bandejas de poliestireno expandido contendo 128 células e mantidas em casa de vegetação, até atingirem o tamanho de plantio. As mudas dos 35 cultivares de tomates foram conduzidas a campo nas

mesmas condições de cultivo seguindo as recomendações técnicas de cultivo da MPASC/ACARESC (1991). Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, com 4 repetições e 4 plantas por parcela. O espaçamento utilizado foi de 1.0 m entre fileiras e 0,5 m entre plantas. Quando as plantas atingiram 2.0 m de altura foi realizada poda apical. Devido à grande diferença entre os materiais avaliados optou-se pela não realização de raleio de flores ou frutos em nenhum material.

Avaliação dos caracteres morfológicos. Foram avaliados 10 descritores com base na lista de descritores para tomate do IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute), listados a seguir: hábito de crescimento (determinado e indeterminado), cor dos frutos maduros (vermelho e amarelo), forma dos frutos (oval, globular, piriforme, retangular, forma de coração, redondo e oblongo), número de lóculos (bi, tri e multilocular), número de sementes por fruto, comprimento do fruto, diâmetro do fruto, peso do fruto, número de frutos por parcela e peso total de frutos por parcela.

Análise estatística: A associação entre os 35 acessos foi realizada através da análise de agrupamentos pelo método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages). As médias dos três anos de cultivos foram utilizadas para análise canônica discriminante. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey em 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SPSS 10.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 35 acessos de tomate *Lycopersicon esculentum*, 23 acessos crioulos e 12 cultivares comerciais, foram avaliados a campo de acordo com as principais características morfológicas (Tabelas 1, 2 e 3). As características morfológicas dos frutos têm grande importância na comercialização e são dependentes da tendência de padrões do mercado preestabelecidas pelo mercado e por consumidores. Os frutos dos cultivares comerciais apresentaram grande uniformidade em tamanho e cor quando comparados com os materiais crioulos. Estas características foram intensamente trabalhadas no processo de melhoramento ao longo do tempo com fins comerciais, de manejo e produção. Em contrapartida os acessos crioulos apresentaram morfologia peculiar com alta variabilidade nas características morfológicas destacando-se em alguns aspectos entre eles sabor acentuado, uma das características muito procurada por consumidores de produtos orgânicos.

Os 23 acessos de tomate apresentaram grande variação para todas as características avaliadas (Tabela 1 e 2, e Figura 1), separando-os em grupos distintos. Para o parâmetro peso de fruto, uma das características importante na separação dos grupos, as maiores médias foram apresentadas pelos acessos crioulos Gaúchos 3 e 4, Coração de Boi 1, 2 e 3, e as menores médias pelos acessos cerejas, com pode ser observado na Tabela 2 (A). Para diâmetro de fruto, novamente, foram os acessos crioulos Gaúchos 3 e 4, que apresentaram maiores médias para diâmetro e para número de sementes. Enquanto que para comprimento de fruto foram os acessos Pimentões 1, 2 e 4 que apresentaram as maiores médias. Para o número de lóculos os acessos crioulos Coração de Boi 1 e 2, e Gaúcho 4, e o cultivar comercial Gaúcho, apresentaram maior número de lóculos. Como esperado os menores valores para peso, comprimento, diâmetro, número de locos e número de sementes, foram observados nos acessos de tomate Cereja.

Tabela 1. Os 35 acessos de tomates agrupados através de algumas características morfológicas dos frutos.

Característica da Planta	Característica do Fruto				
Acesso	Grupos	Crescimento**	Tamanho*	Cor	Forma
1 Cereja 1	crioulo	I	2	Amarelo	Redondo
2 Cereja 2	crioulo	I	2	Vermelho	Cilíndrico
3 Cereja 3	crioulo	I	1	Vermelho	Redondo
4 Cereja 4	crioulo	I	2	Vermelho	Oblongo
5 Cereja 5	crioulo	I	2	Vermelho	Globular
6 Cereja 6	crioulo	I	2	Vermelho	Oblongo
7 Cereja 7	crioulo	I	2	Amarelo	Piriforme
8 Cereja 8	crioulo	I	2	Vermelho	Oblongo
10 Gaúcho 1	crioulo	I	5	Vermelho	Globular
11 Gaúcho 2	crioulo	I	5	Vermelho	Globular
12 Gaúcho 3	crioulo	I	5	Vermelho	Globular
13 Gaúcho 4	crioulo	I	5	Amarelo	Globular
14 Coração de boi 1	crioulo	I	5	Vermelho	Coração
15 Coração de boi 2	crioulo	I	5	Vermelho	Coração
16 Coração de boi 3	crioulo	I	5	Vermelho	Coração
17 Paulista 1	crioulo	I	3	Amarelo	Oval
18 Paulista 2	crioulo	I	3	Vermelho	Oval
19 Paulista 3	crioulo	I	3	Vermelho	Oval
20 Paulista 4	crioulo	I	3	Vermelho	Oval
21 Pimentão 1	crioulo	I	4	Vermelho	Oblongo
22 Pimentão 2	crioulo	I	4	Vermelho	Oblongo
23 Pimentão 3	crioulo	I	5	Vermelho	Oblongo
9 Pimentão 4	crioulo	I	5	Vermelho	Oblongo
24 Polka Baixo	híbrido	II	4	Vinho	Globular
25 Itapuã	híbrido	I	3	Vermelho	Globular
26 Rasteiro R.G	cultivar	I	3	Vermelho	Oval
27 Marglobe	cultivar	I	3	Vermelho	Globular
28 Yuba	cultivar	II	3	Vermelho	Oval
29 M. Pride	híbrido	II	4	Vermelho	Oval
30 Marmande	cultivar	I	3	Vermelho	Globular
31 Jumbo	cultivar	I	3	Vermelho	Redondo
32 Santa Cruz	cultivar	I	3	Vermelho	Oval
33 S. Adélia	cultivar	I	3	Vermelho	Retangular
34 Gaúcho	cultivar	I	5	Vermelho	Globular
35 Santa Clara	cultivar	I	3	Vermelho	Globular

*1. muito pequeno (<3cm); 2. pequeno (3-5cm); 3. intermediário (5.1-8cm); 4. grande (8.1-10cm); 5. muito grande (>10cm). **I – indeterminado, II – determinado.

O acesso crioulo Gaúcho 4 que apresenta frutos de cor amarela dourada quando maduros destacou-se em quatro das cinco variáveis acima citadas apresentando maior diâmetro, maior peso, maior número de lóculos e número de sementes. Este acesso, segundo os agricultores

da região foi trazido pelos imigrantes italianos no final do século XIX, sendo denominado de “pomi d’oro”.

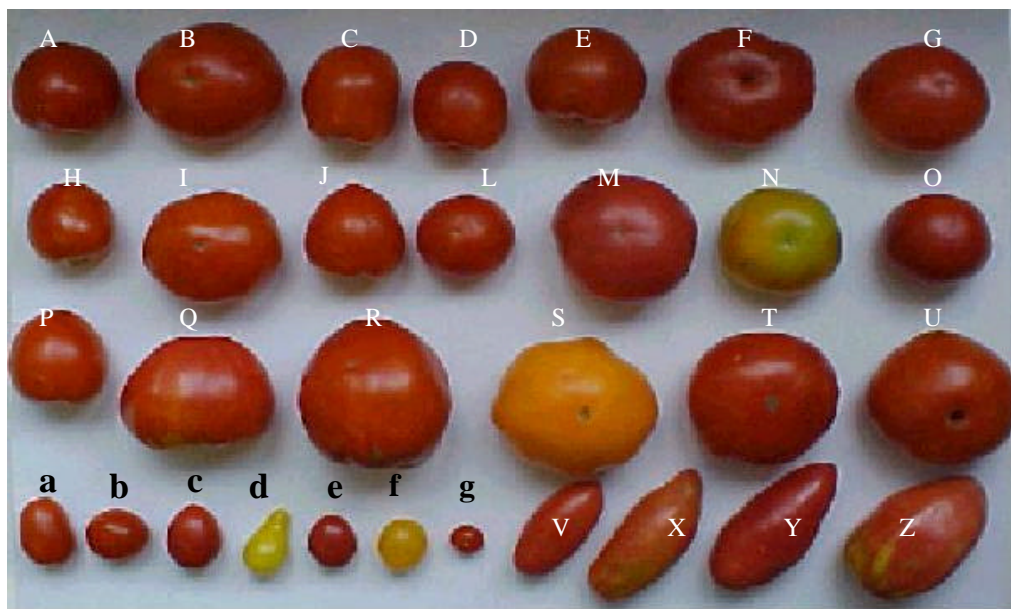


Figura 1. Diferentes frutos de alguns acesos dos tomates: 35 -(A), 27-(B), 18-(C), 31-(D), 29-(E), 34-(F), 20-(G), 25-(H), 30-(I), 33-(J), 32-(L), 24-(M), 17-(N), 18-(O), 14-(P), 15-(Q), 16-(R), 13-(S), 11-(T), 12-(U), 6-(a), 5-(b), 8-(c), 7-(d), 2-(e), 1-(f), 3-(g), 22-(V), 21-(X), 23-(Y), 9-(Z).

Os tomates Cereja, representados por oito materiais, apresentaram média de frutos entre 5g e 35g. Estas médias de peso foram semelhantes às encontradas por Gusmão *et al.*, (2000) e superiores às obtidas por Azevedo-Filho *et al.*, (2001). Os tomates Cereja, diferentes dos outros materiais, germinam e crescem espontaneamente sendo encontrados com frequência em hortas e outros locais. A sua variação morfológica é maior do que a encontrada nos outros tipos de tomate, o que pode estar associado à maior ocorrência de trocas gênicas nestes materiais.

Tabela 2 A. Médias e desvios padrões dos principais descritores morfológicos dos frutos dos 35 acessos de tomate avaliados.

Acesso	Peso	comprimento	diâmetro	n° lóculos	n° sementes
cereja 1	24,21±0,43 ^{lm}	3,89±0,06 ^q	3,21±0,04 ^{op}	2,20±0,07 ^e	85,30±2,54 ⁱ
cereja 2	16,04±0,31 ^{ml}	3,89±0,04 ^q	2,76±0,03 ^p	2,00±0,00 ^e	60,37±1,36 ⁱ
cereja 3	5,90±1,09 ^m	1,94±0,02 ^r	2,26±0,02 ^q	2,00±0,00 ^e	82,53±2,82 ⁱ
cereja 4	30,62±0,78 ^{ilm}	5,18±0,08 ^p	3,20±0,04 ^{op}	2,00±0,00 ^e	77,80±2,58 ⁱ
cereja 5	34,15±0,56 ^{ilm}	3,60±0,04 ^q	3,99±0,03 ^{mn}	2,00±0,00 ^e	111,03±3,15 ⁱ
cereja 6	33,66±0,50 ^{ilm}	5,64±0,07 ^{lmn}	3,34±0,05 ^q	2,00±0,00 ^e	78,93±2,48 ⁱ
cereja 7	21,39±0,59 ^{lm}	5,01±0,04 ^p	2,14±0,11 ^q	2,00±0,00 ^e	62,50±1,28 ⁱ
cereja 8	35,03±1,04 ^{ilm}	5,07±0,08 ^p	3,66±0,04 ^{no}	2,00±0,00 ^e	71,80±4,85 ⁱ
Gaúcho 1	241,01±16,16 ^{ed}	6,05±0,15 ^{ijl}	8,26±0,19 ^{def}	6,40±0,23 ^{bcd}	277,27±21,47 ^{de}
Gaúcho 2	242,26±11,40 ^{ed}	6,03±0,08 ^{ijl}	8,53±0,19 ^{cde}	7,17±0,19 ^{bc}	293,40±17,38 ^{de}
Gaúcho 3	348,30±12,92 ^{abc}	6,46±0,14 ^{gh}	9,90±0,14 ^a	7,20±0,21 ^{bc}	467,33±20,69 ^{ab}
Gaúcho 4	384,41±13,68 ^a	6,75±0,07 ^{defg}	10,12±0,21 ^a	9,43±2,37 ^a	535,33±31,92 ^a
C. de boi 1	357,19±20,45 ^{ab}	8,50±0,14 ^c	9,19±0,16 ^b	7,63±0,18 ^{ab}	393,36±89,98 ^{bc}
C. de boi 2	371,89±80,56 ^{ab}	8,82±0,19 ^c	8,41±0,27 ^{cde}	7,47±0,17 ^{ab}	237,50±15,64 ^{efg}
C. de boi 3	304,05±14,38 ^{abc}	8,64±0,76 ^{mno}	8,39±0,21 ^{de}	7,00±0,16 ^{bc}	291,90±19,29 ^{de}
Paulista 1	189,10±5,14 ^{ef}	5,48±0,07 ^{mno}	7,85±0,08 ^f	4,93±0,17 ^{cd}	183,87±4,27 ^{fgh}
Paulista 2	152,54±3,33 ^{fji}	6,57±0,07 ^{efgh}	6,40±0,11 ^{ghi}	2,23±0,08 ^e	152,87±5,81 ^{ghi}
Paulista 3	135,86±4,00 ^{fghi}	6,94±0,07 ^e	6,09±0,06 ^{ij}	2,30±0,09 ^e	128,77±3,55 ^{hi}
Paulista 4	284,58±12,50 ^{de}	6,76±0,10 ^{defg}	8,75±0,15 ^{bcd}	6,47±0,24 ^{bcd}	305,77±10,22 ^{de}
Pimentão 1	175,95±7,12 ^{efg}	10,66±0,14 ^a	5,99±0,11 ^{ij}	4,40±0,23 ^{dc}	184,37±7,45 ^{fgh}
Pimentão 2	97,52±3,26 ^{ij}	9,24±0,18 ^{ab}	4,53±0,08 ^l	2,00±0,00 ^e	115,60±4,80 ^{hi}
Pimentão 3	83,22±2,85 ^{ijl}	8,43±0,19 ^c	4,40±0,06 ^{lm}	2,67±0,15 ^e	90,93±2,94 ^{hi}
Pimentão 4	173,30±6,46 ^{efgh}	10,57±0,14 ^a	5,88±0,12 ^{ij}	5,97±1,32 ^{bcd}	151,30±9,95 ^{ghi}
Polka Baixo	240,41±6,84 ^{de}	6,39±0,09 ^{ghi}	8,12±0,12 ^{ef}	5,33±0,23 ^{bcd}	238,47±9,47 ^{efg}
Itapuã	153,77±3,31 ^{fghi}	5,59±0,05 ^{ghi}	6,80±0,08 ^g	2,67±0,11 ^e	148,40±5,60 ^{ghi}
R.R. Grande	127,37±3,83 ^{fghi}	7,00±0,07 ^d	6,00±0,08 ^{ij}	2,20±0,08 ^e	123,77±4,82 ^{hi}
Marglobe	240,70±10,77 ^{de}	6,18±0,08 ^{hij}	8,26±0,12 ^{def}	6,37±0,25 ^{bcd}	305,97±20,07 ^{de}
Yuba	108,17±4,18 ^{ghi}	5,81±0,06 ^{ilm}	5,80±0,06 ^j	2,70±0,09 ^e	122,67±4,27 ^{hi}
M. Pride	244,54±11,11 ^{cd}	6,42±0,07 ^{ghi}	8,55±0,13 ^{cde}	5,87±0,29 ^{bcd}	249,03±17,32 ^{ef}
Marmande	199,40±7,17 ^{de}	5,32±0,08 ^{nop}	8,14±0,12 ^{ef}	7,10±0,19 ^{bc}	287,60±12,18 ^{de}
Jumbo	163,78±3,26 ^{fgh}	6,29±0,05 ^{hi}	6,75±0,06 ^g	2,60±0,11 ^e	156,43±5,55 ^{ghi}
Santa Cruz	136,94±2,58 ^{fghi}	6,38±0,07 ^{ghi}	6,13±0,08 ^{hij}	2,00±0,00 ^e	131,23±5,74 ^{hi}
S.Adélia	130,04±3,90 ^{fghi}	6,90±0,11 ^{def}	5,96±0,06 ^{ij}	2,00±0,00 ^e	106,83±4,23 ^{hi}
Gaúcho	282,74±12,10 ^{cd}	5,80±0,13 ^{ilm}	8,93±0,16 ^{bc}	7,50±0,20 ^{ab}	366,10±20,29 ^{cd}
Santa Clara	160,63±5,56 ^{fgh}	6,50±0,06 ^{fgh}	6,62±0,08 ^g	2,20±0,07 ^e	139,27±6,25 ^{hi}

*Médias seguidas de diferentes letras são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p=0,05).

Tabela 2 B. (Continuação) Médias e desvios padrões dos descritores morfológicos combinados dois a dois dos 35 acessos de tomate.

Acesso	CxD*	PxS*	SxL*	NFP*	PFp*	PFH*
Cereja 1	1,21±0,02 ^g	0,30±0,01 ^{hi}	40,18±1,82 ^{hijlm}	1358,00	22,52	36,99
Cereja 2	1,37±0,02 ^f	0,27±0,09 ^{hi}	30,18±0,68 ^m	1240,00	17,19	28,21
Cereja 3	0,90±0,07 ^{mno}	0,07±0,02 ⁱ	41,27±1,41 ^{ghijlm}	2141,00	11,95	19,62
Cereja 4	1,64±0,03 ^e	0,41±0,02 ^{efghi}	38,90±1,29 ^{hijlm}	1282,00	26,92	44,19
Cereja 5	0,90±0,01 ^{lmn}	0,32±0,01 ^{ghi}	55,52±1,57 ^{bcdefgh}	1479,00	28,42	47,66
Cereja 6	1,70±0,03 ^e	0,44±0,02 ^{defghi}	39,47±1,24 ^{hijlm}	1346,00	40,62	66,69
Cereja 7	2,50±0,11 ^a	0,35±0,01 ^{fghi}	31,25±0,64 ^m	1193,00	20,46	33,59
Cereja 8	1,40±0,02 ^f	0,56±0,04 ^{cdefghi}	35,90±2,43 ^{jilm}	579,00	12,90	21,18
Gaúcho 1	0,74±0,03 ^{pqrs}	1,25±0,26 ^{bc}	45,84±4,33 ^{ghijlm}	241,00	28,80	47,28
Gaúcho 2	0,71±0,01 ^{qrs}	1,03±0,20 ^{bcdef}	41,56±2,65 ^{ghijlm}	209,00	40,33	66,21
Gaúcho 3	0,65±0,02 ^s	0,80±0,05 ^{bcdefgh}	66,81±3,84 ^{abc}	100,00	25,88	42,48
Gaúcho 4	0,67±0,01 ^{rs}	0,83±0,08 ^{bcdefgh}	72,52±4,93 ^a	95,00	29,85	48,98
C. de boi 1	0,94±0,03 ^{lm}	1,22±0,10 ^{bc}	53,23±12,97 ^{cdefghi}	43,00	11,90	19,53
C. de boi 2	1,08±0,04 ^{ij}	2,15±0,65 ^a	31,57±2,00 ^{lm}	115,00	32,26	52,96
C. de boi 3	1,05±0,03 ^{ij}	1,23±0,14 ^{bc}	42,66±3,21 ^{ghijlm}	182,00	39,33	64,57
Paulista 1	0,70±0,01 ^{qrs}	1,05±0,04 ^{bcdef}	38,85±1,76 ^{hijlm}	379,00	44,79	78,67
Paulista 2	1,03±0,03 ^j	1,04±0,05 ^{bcdef}	71,36±3,81 ^{ab}	267,00	28,98	47,58
Paulista 3	1,14±0,01 ⁱ	1,08±0,05 ^{bcde}	58,10±2,57 ^{abcdefg}	322,00	31,98	52,50
Paulista 4	0,80±0,02 ^{opqr}	0,96±0,05 ^{bcdefgh}	49,65±2,75 ^{defghij}	130,00	29,67	48,70
Pimentão 1	1,80±0,05 ^d	1,00±0,05 ^{bcdefg}	45,57±3,44 ^{ghijlm}	280,00	31,97	52,49
Pimentão 2	2,06±0,05 ^b	0,89±0,05 ^{bcdefgh}	57,80±2,40 ^{abcdefg}	287,00	25,46	41,79
Pimentão 3	1,91±0,03 ^c	0,95±0,06 ^{bcdefgh}	36,90±2,06 ^{ijlm}	430,00	27,34	44,89
Pimentão 4	1,81±0,04 ^d	1,30±0,09 ^b	32,53±2,73 ^{lm}	227,00	26,65	43,75
Polka Baixo	0,79±0,01 ^{opq}	1,06±0,05 ^{bcde}	46,84±2,52 ^{fghijlm}	218,00	38,31	62,90
Itapuã	0,83±0,01 ^{nop}	1,06±0,06 ^{bcde}	58,17±2,94 ^{abcdefg}	372,00	34,68	56,94
R.Grande	1,20±0,02 ^{gh}	1,06±0,04 ^e	57,86±2,74 ^{abcdefg}	343,00	31,93	52,42
Marglobe	0,75±0,01 ^{pqrs}	0,84±0,04 ^{bcdefgh}	48,42±2,90 ^{efghijl}	224,00	37,51	61,58
Yuba	1,00±0,01 ^{jl}	0,90±0,03 ^{bcdefgh}	47,27±1,86 ^{efghijlm}	439,00	36,58	60,05
M. .Pride	0,75±0,09 ^{pqrs}	1,21±0,15 ^{bc}	45,76±3,89 ^{ghijlm}	203,00	44,73	73,44
Marmande	0,65±0,07 ^s	0,74±0,05 ^{bcdefgh}	41,42±2,16 ^{ghijlm}	287,00	44,92	73,75
Jumbo	0,93±0,08 ^{lm}	1,10±0,05 ^{bcde}	63,68±3,59 ^{abcde}	344,00	42,90	70,44
Santa Cruz	1,04±0,02 ^{ij}	1,12±0,07 ^{bcd}	65,62±2,87 ^{abcd}	292,00	30,92	50,77
S.Adélia	1,15±0,01 ^{gh}	1,26±0,05 ^{bc}	53,42±2,11 ^{cdefghi}	428,00	44,77	73,49
Gaúcho	0,65±9,80 ^s	0,91±0,1082 ^{bcdefgh}	52,02±3,77 ^{cdefghij}	220,00	52,51	86,21
Santa Clara	0,99±0,02 ^{jl}	1,18±0,04 ^{bcd}	63,33±2,00 ^{abcdef}	393,00	52,62	86,39

*CXD (comprimento versus diâmetro); PXS (peso versus semente); SXL (semente versus lóculos); NFP (número de frutos por parcela); PFp (kg/parcela); PFH (T/hectare).

*Médias seguidas de diferentes letras são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p=0,05).

Quando avaliadas as características combinadas duas a duas (tabela 2 B Continuação), a maior média para o parâmetro comprimento versus diâmetro foi apresentada pelo acesso Cereja 7 com fruto em forma de pêra. Para peso versus número de semente quem apresentou a maior média foi o acesso Coração de Boi 2 e para número de lóculos versus número de sementes os acessos Gaúchos 3 e 4, o acesso Paulista 1 e 2 e os cultivares comerciais Itapuã, Rasteiro Rio Grande, Jumbo e Santa Cruz apresentaram as maiores médias.

A produção de frutos obtida no acesso Cereja 3 foi de 19,62 t/ha e no acesso 6 foi de 66,69 t/ha, sendo a menor e a maior média, respectivamente, dentro deste grupo (Tabela 2 B). Para os acessos tipo Pimentão a produção estimada variou entre 41,79 e 52,49 t/ha, que ficou abaixo da média produzida pelos cultivares comerciais tipo Paulista (os mais semelhantes a estes), que chegou a aproximadamente 65 t/ha. O cultivar comercial Gaúcho produziu 86,21 t/ha, com média superior aos acessos crioulos Gaúchos que foi de 51,00 t/ha, e aos acessos Coração de Boi que produziram em média 45,33 t/ha. Considerando a média de produção nacional que é de 54,55 t/ha (FAO 2002), alguns acessos crioulos apresentaram médias superiores, indicativos de potencial econômico.

O dendrograma construído pela análise de agrupamento UPGMA separou os acessos em seis grupos de similaridade (Figura 2). O grupo I foi formado pelos acessos do tipo Paulista, predominando materiais comerciais, apenas dois acessos crioulos Paulista 2 e 3. O grupo II foi formado pela grande maioria dos materiais com frutos grandes globulares e multiloculares, compreendendo os tomates tipos gaúchos dos acessos crioulos e os materiais comerciais e híbridos e dois tipo paulista. O grupo III foi formado pelo acesso crioulo Gaúcho 4 que apresenta diversas características morfológicas peculiares, entre elas a coloração amarela (pomi d'oro) e outras. O grupo IV foi formado pelos quatro acessos crioulos do tipo Pimentão 1, 2, 3 e 4. O

grupo V formado por acessos crioulos Coração de Boi 1, 2 e 3. O grupo VI foi formado pelos oito acessos Cereja com frutos muito pequenos.

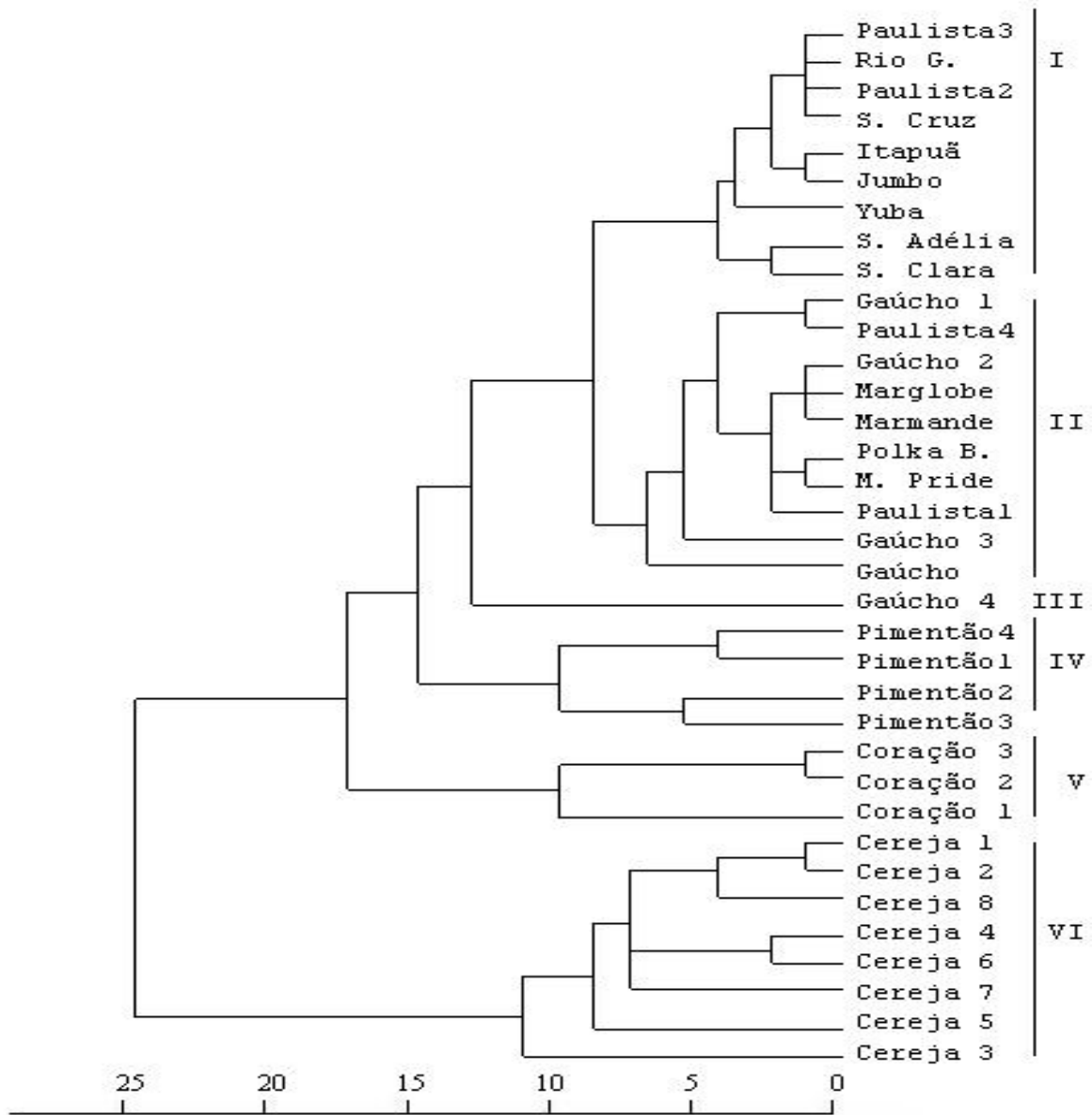


Figura 2. Dendrograma baseado nos descritores morfológicos entre os acessos de tomate construído por análise de agrupamento (UPGMA).

Apenas no grupo II com a maioria do tipo Gaúcho, ou derivados deles, foram incluído dois acessos crioulos que a priori foram colocados no grupo dos Paulistas, este fato pode ser explicado pela caracterização dos grupos inicialmente levando-se em conta apenas a morfologia externa dos frutos.

O gráfico de distribuição com base nas funções discriminantes (Figura 3) separou os acessos de tomate confirmando os agrupamentos de acordo com as características morfológicas dos seus frutos (Gaúcho e afins, Paulista, Pimentão, Coração de Boi e Cereja).

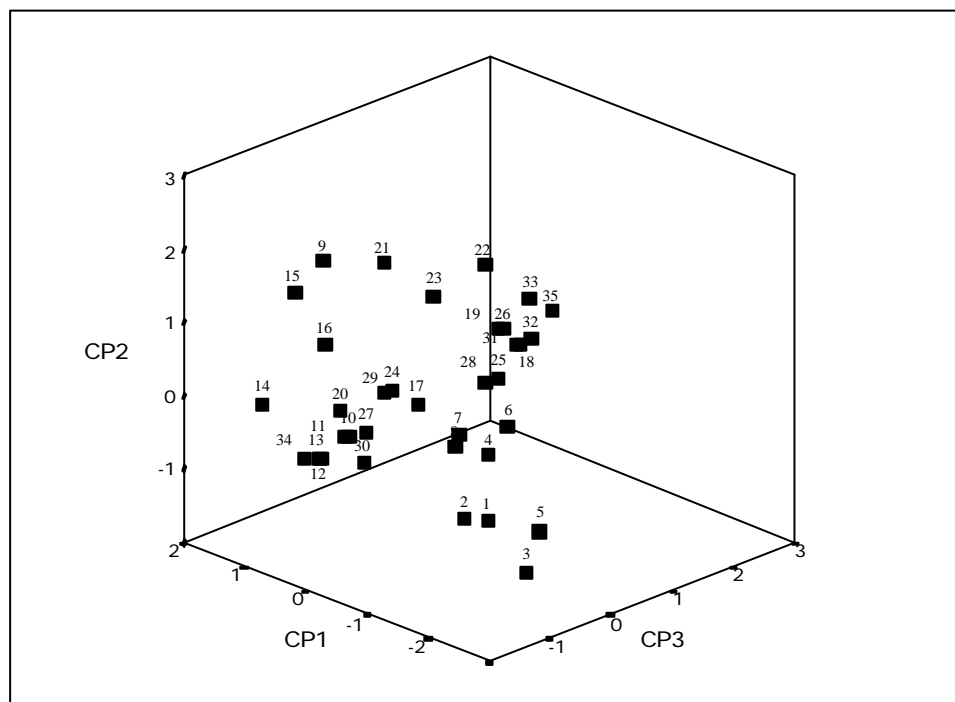


Figura 3. Distribuição dos 35 acessos de tomates com bases nas distâncias Euclidianas médias dos grupos Cerejas (1 ao 8), dos Corações de Boi (14, 15 e 16), dos Pimentões (9,21, 22 e 23), dos Paulistas (18, 19, 25, 26, 28, 31, 32, 33, 35) e dos Gaúchos (10, 11, 12, 13,17, 20, 24, 27, 29, 30, 34).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo Filho, J.A., Melo, A.M.T., 2001. Avaliação de tomate silvestre do tipo cereja. Horticultura Brasileira, Brasília, v.19, suplemento CD-ROM, julho 2001.
- Bettencourt, E., Konopka, J., 1990. IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). Descriptors list for Tomato. p. 11-45.
- Egashira, H., Ishirara, H., Takashira, T., Imanishi, S., 2000. Genetic Diversity of the 'Peruvianum Complex' *L. peruvianum* L (Mill) and *L. Chilense* (Dun) revealed by RAPD analysed. Euphytica. 116 23-31.
- FAO., 2002 Agriculture & food trade: Tomatoes production. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org>.
- Gusmão, S. A. L., Pádua, J. G. de, Gusmão, T. A.de, Braz. L. T., 2000. Efeito da densidade de plantio e forma de plantio e forma de tutoramento na produção de tomateiro tipo "cereja" em Jaboticabal. Horticultura Brasileira v.18 (suplemento 2000).
- Hoyt, E., 1995. Conservação dos Parentes Silvestres das Plantas Cultivadas. 53 p.
- Melo, P. C. T., 1989. Melhoramento Genético do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Campinas pp. 55
- Peixoto, J. R., Oliveira, C. M., Silva, R. P., de Angelis, B., Cecílio-Filho, A. B., 1999. Avaliação de genótipos de tomateiro tipo Santa Cruz no período de inverno, em Araguari, Mg. Pesq. Agropec. Bras. 34(12):2247-2251.
- Rick, C. M., 1978. The tomato. Sci. Americ. 239 (6): 76-87.
- Rick, C. M., 1983. Genetic variability in tomato species. Plant Molecular Biology Reporter 1
- Rick, C. M., 1987. Genetic resource in *Lycopersicon*. In tomato biotechnology. A.L. Publishers. pp.17-26.

Rick, C.M., Laterrot, H., Philouze, J., 1990. A revised key for the *Lycopersicon* species. Rep. Tom Gen. Coop. 40:31.

4. ESTIMATIVA DE VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DE SEMENTES EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE *Lycopersicon esculentum* Mill. DO SUL DO BRASIL.

**ESTIMATIVA DE VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE
PROTEÍNAS DE SEMENTES EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES
COMERCIAIS DE *Lycopersicon esculentum* Mill. DO SUL DO BRASIL.**

Bernardete Primieri Carelli¹, Lee Tseng Sheng Gerald¹, Fabio Luis Maciel², Sergio Echeverrigaray²

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Via Anhanguera, Km174, Caixa Postal 153, Araras SP, Brasil

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, R.Francisco Getúlio Vargas,1130, Caxias do Sul, 95001-970, RS Brasil

ABSTRACT

Seed protein electrophoretic profiles (SDS-PAGE) of 37 tomato accessions including 14 cultivars and 23 Brazilian landraces were analyzed. Twelve polymorphic protein bands were identified, scored and used for multivariate analysis. Cluster analysis allowed for the identification of five affinity groups. The variation among commercial cultivars was smaller than that among landraces corroborating the general concern of “bottleneck” effect due to domestication and breeding in *Lycopersicon esculentum* L. Discriminant analysis confirmed the difference in protein patterns between commercial cultivars and Brazilian landraces. No clear relations were detected between protein patterns and fruit characteristics.

Key word: electrophoretic analysis, *Lycopersicon esculentum*, Seed protein.

RESUMO

Foram analisados através de perfis eletroforéticos de semente (SDS-PAGE), 37 acessos de tomates (*Lycopersicon esculentum*) sul brasileiros, dos quais 14 são cultivares comerciais e 23 acessos crioulos. Foram selecionadas 12 bandas polimórficas e utilizadas para análise multivariada. A análise de agrupamento permitiu identificar cinco grupos de afinidade. A variação entre cultivares comerciais foi menor do que entre acessos crioulos, concordando com o resultado obtido por outros autores e corroborando com o consenso geral de afinamento genético como consequência da domesticação e reprodução de *L. esculentum* fora do centro de origem. A análise discriminante confirmou a diferença em padrões de proteína entre cultivares comerciais e os acessos crioulos. Entretanto nenhuma relação clara foi encontrada entre padrões de proteínas e características de fruto.

Palavras chave: análise eletroforética, *Lycopersicon esculentum* e proteínas de sementes,

INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) é uma das hortícolas mais importantes na alimentação mundial. Hoje, centenas de variedades de tomate são cultivadas e consumidas em muitas partes do mundo. A maioria destas variedades é resultante de programas de melhoramento genético com especial enfoque a características agrônômicas de interesse comercial como qualidade de fruto, tempo de maturação e resistência a doenças (Rick, 1991).

Alem disso, coleções formadas por espécies selvagens, cultivares antigas e materiais crioulos são mantidas e multiplicadas por diferentes instituições. Este fato demonstra a necessidade de uma melhor caracterização e discriminação das variedades de tomate considerando-se que a espécie, ao longo de sua domesticação e melhoramento, passou por um drástico afinamento genético, com grande perda da variabilidade original (Rick & Fobes, 1974). Porém é provável que alguns genes importantes, estejam presentes em espécies antigas ou crioulas, por serem materiais pouco trabalhados em termos de melhoramento genético (Rick, 1982).

Hoje, na região da Serra Gaúcha, o tomate cultivado pode ser separado em dois grupos: um formado por materiais crioulos mantidos por pequenos agricultores, os quais são mantidos no banco de germoplasma do Centro Ecológico de Ipê, consolidado através de mais de 20 anos de coleta e resgate de sementes na região nordeste do Rio Grande do Sul, e o outro por cultivares e híbridos comercializados por companhias de semente importadoras.

O resgate destes materiais tem como objetivo a conservação de recursos genéticos das plantas cultivadas, neste caso o tomate, permitindo o acesso ao material genético para desenvolvimento de novas variedades revertendo em benefício para toda a sociedade.

A falta de informação sobre sua origem, características agronômicas e constituição genética têm limitado o uso destes materiais crioulos em programas de melhoramento. Assim sendo, o aumento de informações genéticas e agronômicas, entre outras, destes materiais espalhados pelo Brasil pode contribuir para a sua utilização racional dentro dos programas de melhoramento e de alargamento de sua base genética.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade dos acessos da coleção de tomate crioulos oriundos do Centro Ecológico de Ipê e de materiais mantidos por pequenos agricultores, e de cultivares comerciais, através da análise das proteínas de sementes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico. No presente trabalho foram utilizados 37 acessos de *L. esculentum*, sendo 23 acessos crioulos, pertencentes ao banco de germoplasma do Centro Ecológico de Ipê consolidado através de mais de 20 anos de coleta e resgate de sementes na região nordeste do Rio Grande do Sul, e 14 cultivares comerciais que foram doadas pelas empresas Feltrin e ISLA, os mais cultivados nesta região (Tabela 1).

Extração de proteínas solúveis de sementes. Foram esmagadas 15 sementes de cada acesso com auxílio de pistilo até a obtenção de um pó fino. A este pó foi adicionada solução tampão extração (10mM Tris-HCl (pH 6,8), acrescida de 0,5% de 2-mercaptoethanol) e os materiais foram incubados por 20 min a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi alicotado e adicionado igual volume de solução tampão de desnaturação (50mM Tris-HCl pH 6,8, 0,3% de 2-mercaptoethanol e 0,005% de azul bromofenol), e foram

submetidas a aquecimento em banho-maria fervente por 10 min. para desnaturadas. As amostras foram armazenadas a -20°C até a separação eletroforética.

Separação eletroforética. A separação das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 14%; 160 x 140 x 1 mm), em condições alcalinas (Laemmli *et al.*, 1970). A separação foi conduzida à 80V até alcançar o gel separador (inferior). A voltagem foi aumentada para 150V constantes e mantida até o final da corrida. Após a separação o gel foi tratado com solução fixadora de ácido tricloroacético (ácido acético 7%, metanol 30% e água 63 %) por 30 min, para a fixação das proteínas. O gel foi corado e revelado utilizando-se uma solução a base de Coomassie Brilliant Blue R 250 (0,05% de Coomassie em solução fixadora). Os géis corados foram digitalizados para posterior análise. Como padrão de peso molecular foi utilizado o kit LMW-SDS Marker Pharmacia TM, contendo polipeptídios de 97, 66, 45, 30, 20.1 e 14.4 kDa.

Análise estatística. Os géis foram submetidos a uma avaliação semiquantitativa usando o programa Kodak 1D que gerou uma matriz com a intensidade e o peso molecular de cada banda. Todos os teste foram realizados em triplicata, e as médias dos valores foram usadas para formar a matriz. Os dados da matriz foram submetidos à análise multivariada com a ajuda do programa SPSS 10.1. Foram calculadas as distâncias euclidianas padronizando os valores (x/S_x , sendo “x” o valor observado e “ S_x ” o desvio padrão da variável). Estas distâncias foram utilizadas para a obtenção de um dendrograma através do método UPGMA, a análise de componentes principais e análise canônica discriminantes.

Tabela 1. Lista dos trinta e cinco acessos de tomate (*L. esculentum*) utilizados neste estudo.

Dados da planta			Dados morfológicos do fruto			
Acessos	tipo	Crescimento.**	No.lóculos	Tamanho*	cor	Formato
Cereja 1	crioulo	I	2	2	amarelo	redondo
Cereja 2	crioulo	I	2	2	vermelho	oblongo
Cereja 3	crioulo	I	2	1	vermelho	redondo
Cereja 4	crioulo	I	2	2	vermelho	oblongo
Cereja 5	crioulo	I	4	2	vermelho	globular
Cereja 6	crioulo	I	2	2	vermelho	oblongo
Cereja 7	crioulo	I	2	2	amarelo	piriforme
Cereja 8	crioulo	I	2	2	vermelho	oblongo
Gaúcho 1	crioulo	I	>8	5	vermelho	globular
Gaúcho 2	crioulo	I	>8	5	vermelho	globular
Gaúcho 3	crioulo	I	>8	5	vermelho	globular
Gaúcho 4	crioulo	I	>8	5	laranja	globular
Paulista 1	crioulo	I	4	3	amarelo	oval
Paulista 2	crioulo	I	2	3	vermelho	oval
Paulista 3	crioulo	I	2	3	vermelho	oval
Paulista 4	crioulo	I	2	3	vermelho	oval
Coração de boi 1	crioulo	I	>8	5	vermelho	coração
Coração de boi 2	crioulo	I	>8	5	vermelho	coração
Coração de boi 3	crioulo	I	>8	5	vermelho	coração
Pimentão 1	crioulo	I	2	4	vermelho	oblongo
Pimentão 2	crioulo	I	2	4	vermelho	oblongo
Pimentão 3	crioulo	I	4	5	vermelho	oblongo
Pimentão 4	crioulo	I	2	5	vermelho	oblongo
Polka Baixa	híbrido	II	>4	4	vinho	globular
Itapuá	híbrido	I	2 - 3	3	vermelho	globular
Rasteiro R. G.	cultivar	I	2	3	vermelho	oval
Marglobe	cultivar	I	>6	3	vermelho	globular
Yuba	cultivar	II	2 - 3	3	vermelho	oval
Mountain Pride	híbrido	II	>6	4	vermelho	oval
Marmande	cultivar	I	>8	3	vermelho	globular
Jumbo	cultivar	I	2 - 3	3	vermelho	redondo
Santa Cruz	cultivar	I	2	3	vermelho	oval
Santa Adélia	cultivar	I	2	3	vermelho	retangular
Gaúcho	cultivar	I	>8	5	vermelho	globular
Santa Clara	cultivar	I	2	3	vermelho	globular

*(1) muito pequeno (<3cm); (2) pequeno (3-5cm); (3) médio (5.1-8cm); (4) grande (8.1-10cm); (5) muito grande (>10cm). ** I- indeterminado, II- determinado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas 12 bandas as que apresentaram mais alta reprodutibilidade entre as repetições como variáveis para análise estatística. Perfis típicos de proteínas de sementes de tomate e as bandas selecionadas são mostrados na Figura 1. Os perfis eletroforéticos dos 37 genótipos de tomates mostraram variações quantitativas e qualitativas. As bandas 1, 2, 4, 6 e 10 estavam ausentes em alguns genótipos.

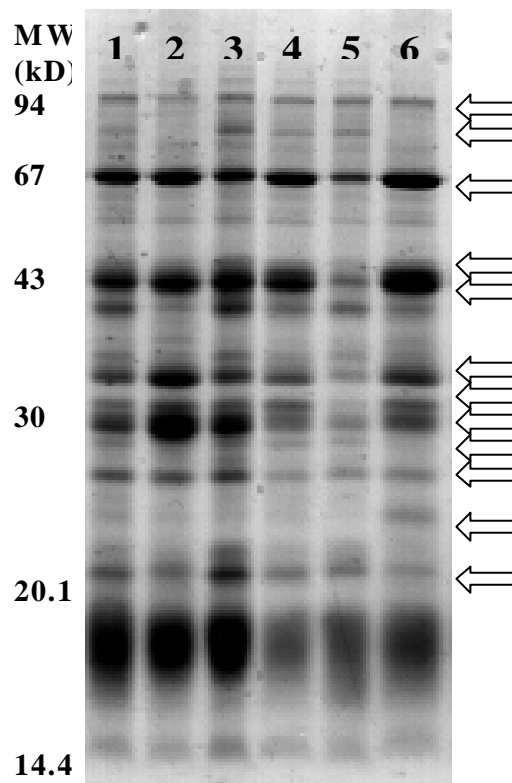


Figura 1. Perfis eletroforéticos demonstrativos de proteínas de sementes de tomate. Setas indicam as 12 bandas selecionadas na ordem decrescente (1-12). Os nº 1 a 6 indicam o acesso de tomate. 1- Marmande, 2- Gaúcho, 3- cereja 2, 4- pimentão 3, 5- cereja 8 e 6- Santa Clara.

A análise eletroforética das proteínas totais de sementes permitiu identificar os 37 materiais analisados, apesar de apresentarem baixa variabilidade, especialmente em termos qualitativos. Este resultado confirma o baixo nível de variabilidade e a capacidade de identificação de cultivares de tomate por meio de diferentes tipos de marcadores de DNA (Williams & St. Clair 1993; Paran *et al.*, 1995; Noli *et al.*, 1999), de isoenzimas (Rick e Forbes, 1974; Tanksley, 1979; Medina-Filho, 1980; Tanksley e Jones, 1981) e de proteínas de sementes (van der Berg, 1990 e 1991). No que diz respeito à análise de proteínas de sementes, Chakraborti *et al.*, (1992) identificou nove cultivares de tomate usando perfis protéicos em gel de poliacrilamida, e Wang *et al.*, (2000) pôde discriminar 11 variedades de tomate usando focalização isoeletrica em membrana (UTLIF).

A média da distância euclidiana foi calculada entre cada par de genótipos. A menor distância (0.432) foi encontrada entre os acessos Cereja 7 e Pimentão 2, e a maior distância (45.614) entre o acesso Gaúcho 4 e o acesso Paulista 2.

A análise de agrupamentos através do método UPGMA com base nos dados protéicos permitiu a construção de um dendrograma e a separação dos 37 acessos analisados em cinco grupos de afinidade (Figura 2). O grupo I foi formado por 28 acessos, subdividido em cinco subgrupos, I.1; I.2; I.3; I.4 e I.5. O grupo II foi formado pelo acesso Gaúcho 1 e o grupo III formado pelo acesso Cereja 3. Grupo IV foi formado pelo cultivar comercial Marmande e o híbrido Mountain Pride. O grupo V formado por cinco acessos, quatro acessos crioulos e o híbrido Itapuã.

Os acessos crioulos apresentaram mais variação nas proteínas de suas sementes que os cultivares comerciais, que é verificado pela distribuição dos materiais crioulos ao longo de todo o dendrograma, e o agrupamento de nove dos 14 cultivares comerciais dentro de apenas dois subgrupos (I.4 e I.5).

Os acessos crioulos Cereja 2 e Cereja 8, agruparam-se junto aos tomates indústria e ao cultivar comercial Gaúcho, respectivamente. Como a origem dos acessos crioulos é incerta, este resultado sugere que os acessos Cereja 2 e 8 podem ser derivados de cultivares comerciais antigos que tem participado na formação dos novos cultivares comerciais.

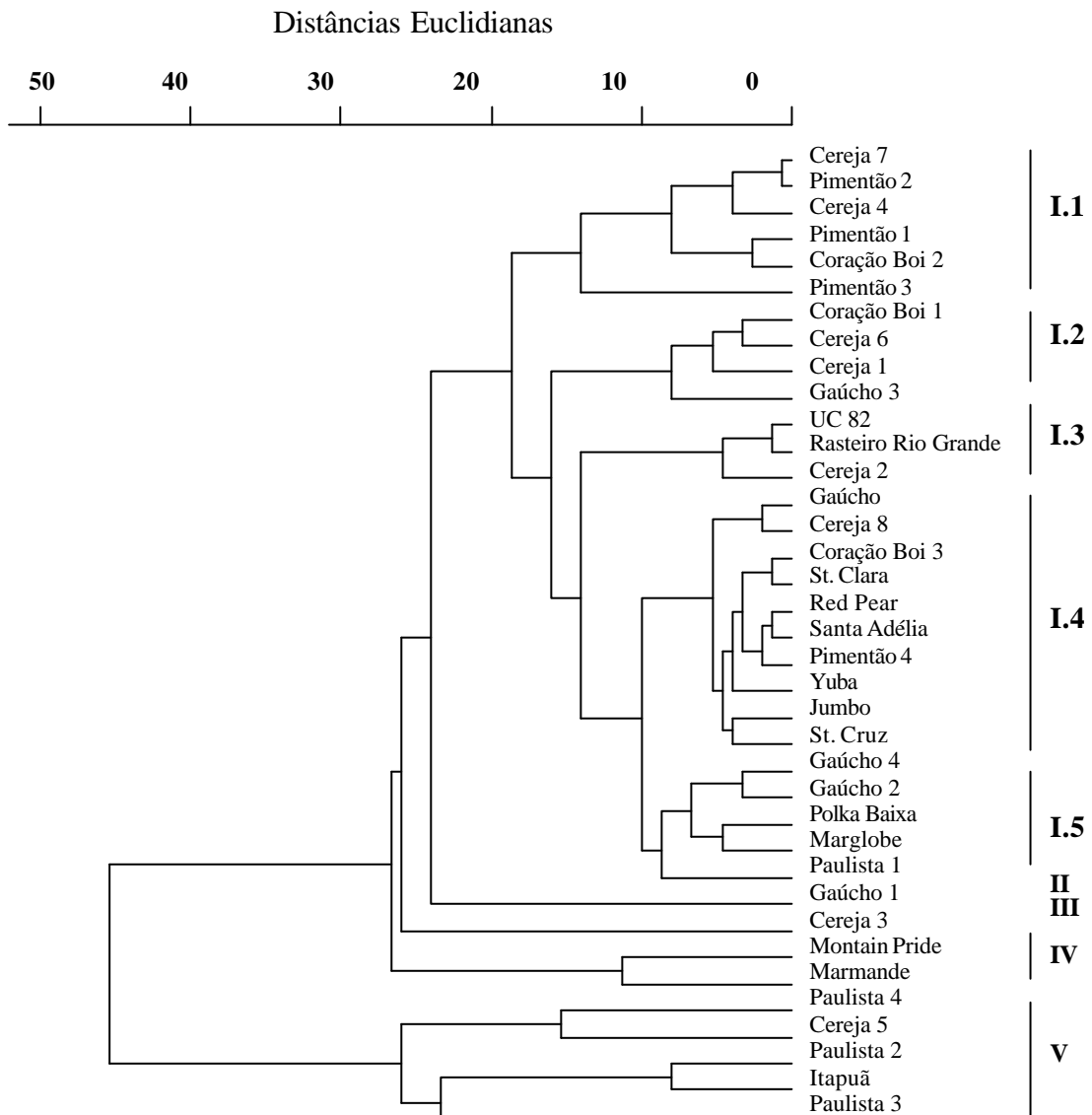


Figura 2- Dendrograma baseado na análise quantitativa dos perfis eletroforéticos de proteínas totais das sementes dos 37 acessos de tomate.

Embora não foi observada uma relação clara entre os grupos e as características morfológicas dos frutos, três dos quatro acessos crioulos com frutos de forma cilíndrica (Pimentão 1, 2 e 3), foram agrupados no subgrupo I.1, e os representantes do tomate indústria, UC 82 e Rasteiro Rio Grande, foram agrupados próximos dentro de subgrupo I.3. O subgrupo I.5 foi formado por quatro tomates salada, sendo três acessos crioulos e o híbrido comercial Polka Baixo com frutos grandes e formato arredondado. Dentro de grupo V ficaram agrupados quatro tomates crioulos e o híbrido Itapuã, todos com frutos redondos do tipo paulista.

A análise canônica discriminante confirmou as diferenças entre os três grupos de acessos de tomates avaliados, quais sejam, materiais crioulos, materiais comerciais para consumo in natura, e materiais para industrialização (Figura 3). A separação de variedades de tomates indústria e de tomates salada, também foi detectada através de marcadores de RAPD por Noli *et al.*, (1999).

As variáveis que mais contribuíram para a separação dos materiais crioulos dos outros materiais foram as variáveis 7 e 9, correspondentes às bandas de peso molecular aproximado de 31 e 28 kDa, respectivamente. Já as variáveis mais importantes na separação dos materiais indústria dos outros dois grupos foram aquelas correspondentes as bandas de peso molecular aproximado de 26 e 30 kDa (variáveis 8 e 10). Como pode ser observado, as quatro variáveis discriminantes, apresentaram pesos moleculares próximos, o que sugere pertencerem a um grupo protéico específico. Famílias de proteínas com elevada capacidade discriminante entre populações de origens genéticas distintas têm sido observadas em outras espécies vegetais, por exemplo, as faseolinas de *Phaseolus* capazes de discriminar entre populações e entre materiais de origem andina e Mesoamérica (Echeverrigaray *et al.*, 1993; Maciel *et al.*, 1999), as gliadinas de *Triticum*, capazes de separar materiais melhorados para panificação ou outras finalidades (Beleia

& Mandarino, 1991; Binneck *et al.*, 2002), e as hordeinas de *Hordeum vulgare* (Nevo *et al.*, 1983).

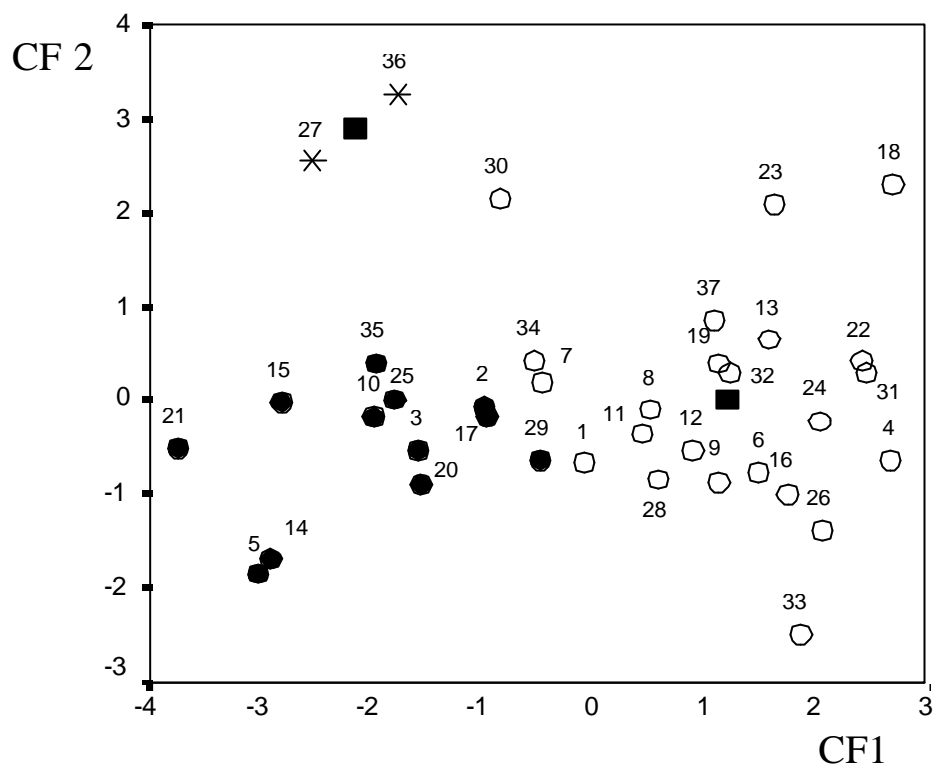


Figura 3. Distribuição dos tomates comerciais e acessos crioulos de acordo com as funções canônicas discriminantes. ■ Grupo centróide, * tomates indústria, ● tomates comerciais (salada e híbridos) e ○ tomates crioulos.

A baixa variação observada entre cultivares comerciais, comparada com aquela encontrada entre acessos crioulos, assim como a variação entre estes dois grupos, está de acordo com a hipótese de que o tomate cultivado sofreu afunilamento drástico em sua base genética imposta por sua evolução durante a domesticação, e mais tarde pela reprodução, seleção e melhoramento utilizando materiais de coleções de base genética limitadas. Este pensamento geral

tem sido confirmado por estudos realizados com diversos tipos de marcadores (Rick & Fobes, 1974; Rick ,1976; Helentjaris *et al.*, 1985; Rick ,1991; Saavedra *et al.*, 2001).

A maior variabilidade encontrada nos acessos crioulos torna este grupo importante fonte de variabilidade genética, podendo contribuir para bancos de germoplasma e para o alargamento da base genética em programas de melhoramentos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beleia, A., Mandarino, J. M. G., 1991. Characterization of wheat cultivars by gliadin polyacrylamide gel electrophoresis. *Arq. de Biol.* 34(3-4): 475-485.
- Berg, B.M. van den., 1990. Inbred testing of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) F1 varieties by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. *Electrophoresis*, 11, 824-829.
- Berg, B.M van den, 1991. A rapid and economical method for hybrid purity testing of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) F1 hybrids using ultrathin-layer isoelectric focusing of alcohol dehydrogenase variants from seeds. *Electrophoresis*, 12, 64-69.
- Binneck, E., Nedel, J. I., Dellagostin, O.A.,Peske, S. T., Barros A. C. S. A., 2002. Numerical analysis of gliadins electrophoregrams of triticale cultivars. *Revista Brasileira de sementes*, 24(1);322-330.
- Chakraborti, A.K., Das, A.K. and Chattopadhyay, N.C., 1992. Identification of some Indian tomato cultivars by polyacrilamide gel electrophoresis of seed proteins. *Seed Research*, 20, 10-13.
- Echeverrigaray, S., Carvalho, M. T. V., Pompeu, A. S., Derbyshire, E., 1993. Affinity grouping of closely related lines of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) through comparative electrophoresis of seed proteins. *Rev. Brasil. Genet.* 16: 759-771.

- Helentjaris, T., King, G., Slocum, M., Siedenstrang, C. and Wegman, S., 1985. Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their tools for applied plant breeding. *Plant Molecular Biology*. 5: 109-116.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227:680-685.
- Maciel, F.L., Gerald, L.T.S., Echeverrigaray, S., 1999. Variation in phaseolin and other soluble proteins among cultivars and landraces of common beans of south-Brazil. *J. Genet. & Breed.* 53:149-154.
- Medina-Filho, H.P., 1980. Linkage of Aps-1, Mi and other markers of chromosome 6. Report of Tomato Genetic Cooperative. 30:26-28.
- Nevo, E., Beiles, A., Storch, N, Doll, H., Andersen, B., 1983. Microgeographic edaphic differentiation in hordein polymorphism of wild barley. *Theor. Appl. Genet.* 64: 123-132.
- Noli, E., Conti, S., Maccaferri, M. and Sanguineti, M.C., 1999. Molecular characterization of tomato cultivars. *Seed Science and Technology*. 27:1-10.
- Paran, I., Horowitz, M., Zamir, D. and Wolf, S., 1995. Random amplified polymorphic DNA markers are useful for purity determination of tomato hybrids. *HortScience*. 30:377.
- Rick C. M., 1982. The potencial of exotic germplasm for tomato improvement. In: Vasil IK, Scowcrot WR, Frey Hj (eds) *Plant improvement and somatic cell genetcs*. Acad Press, New York, pp 478-495.
- Rick, C.M., 1976. Tomato. In: Simmonds, N.W. (ed) *Evolution of crop plants*. Longman, London, pp 269-273.
- Rick, C.M., 1991. Tomato paste: A concentrated review of genetic highlights form the beginning to the advent of molecular genetic s. *Genetics*. 128: 1-5.

- Rick & Forbes, J.F., 1974. Association of an allozyme with nematode resistance. Report of Tomato Genetic Cooperative. 24: 25.
- Saavedra, G., Spoor, W, Harrier, L., 2001. Molecular markers and genetic base broadening in *Lycopersicon* spp. Acta Hort. 546: 503-507.
- Tanksley, S.D., 1979. Linkage, chromosomal association and expression of Adh-1 and Pgm-2 in tomato. Biochemical Genetics. 13: 1159-1167.
- Tanksley, S.D., Jones, R.A., 1981. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F1 hybrids of tomato. Horticultural Science. 16: 179-181.
- Wang, X.F., Knoblauch, R. and Leist, N., 2000. Varietal discrimination of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. Seed Science and Technology. 28: 521-526.
- Williams, C.E. and St. Clair, A.A., 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. Genome. 36: 619-630.

**5. ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES
RAPD EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE *Lycopersicon
esculentum* Mill. DO SUL DO BRASIL.**

**ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES
RAPD EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE *Lycopersicon
esculentum* Mill. DO SUL DO BRASIL.**

Bernardete Primieri Carelli¹, Lee Tseng Sheng Gerald¹, Felipe Gobbi Grazziotin², Sergio Echeverrigaray²

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Via Anhanguera, Km 174, Caixa Postal 153, Araras SP, Brasil

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, R.Francisco Getúlio Vargas,1130, Caxias do Sul, 95001-970, RS, Brasil

ABSTRACT

Random amplified polymorphic DNA markers (RAPD) were used to estimate the variability of 35 tomato accessions (*Lycopersicon esculentum* Mill.). A total of 257 reproducible scorable bands were obtained from 20 primers, 78,6% of which was polymorphics. The percentage distribution of RAPD markers shows that most RAPD markers are amplified with a low or high frequency, and the frequency of rare alleles is similar in commercial and landrace accessions. Genetic distances among accessions were calculated and a dendrogram showing the genetic relationships among them was constructed allowing for the separation of seven groups. Most Brazilian accessions (78%) fell within one group, whereas the commercial cultivars were distributed among all the groups. Discriminant analysis allowed to separate Brazilian landraces and commercial cultivars, as well as to differentiate among accessions according with their fruit shape.

Key words: Genetic variability, *Lycopersicon esculentum*, RAPD.

RESUMO

Marcadores RAPD foram usados para estimar a variabilidade genética em 35 acessos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Com o uso de 20 *primers*, foi obtido um total de 257 bandas, sendo 78,6% bandas polimórficas. A distância genética entre os acessos foi calculada e um dendrograma foi construído mostrando o relacionamento genético. Apesar da baixa variabilidade encontrada (67,8% de média de distância genética) foram identificados sete grupos. A porcentagem de distribuição dos marcadores RAPD mostrou que muitos dos marcadores RAPD são amplificados com uma frequência maior ou menor e a frequência de alelos raros é similar nos dois grupos, acessos crioulos e acessos comerciais. A maioria dos materiais crioulos (78%), encontram-se em um mesmo grupo, enquanto que os acessos comerciais foram distribuídos dentro de todos os grupos. A análise discriminante permitiu separar cultivares comerciais dos cultivares crioulas, bem como diferenciar os mesmos pela morfologia do fruto.

Palavras chaves: *Lycopersicon esculentum*, RAPD, Variabilidade Genética.

INTRODUÇÃO

O tomate moderno (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tem seu centro primário de diversidade num estreito cinturão ao longo da região andina. A hipótese mais aceita para a domesticação do tomate cultivado é que a subespécie *cerasiforme*, encontrada como erva espontânea na região andina, migrou para o México onde foi domesticada e levada para a Europa no século XVI, e então, disseminada para muitas partes do mundo, incluindo o Brasil (Rick, 1976).

Durante sua evolução e domesticação o tomate passou por processos de afinamento genético impostos pelo efeito fundador das populações coletadas, pela autopolinização, seleções naturais e seleções artificiais, bem como reprodução a partir de coleções limitadas, particularmente na Europa e América Central (Rick, 1991).

Com o crescente desenvolvimento da agricultura surgiu a necessidade de melhorar as espécies cultivadas e tornou necessário caracterizar melhor a variabilidade genética do germoplasma dos genótipos cultivados. Inicialmente a variabilidade genética era estimada através da avaliação das características morfológicas. Embora estas características sejam informativas e práticas, especialmente as quantitativas, elas estão sujeitas a influências ambientais durante sua domesticação e melhoramento. Entretanto com o desenvolvimento dos marcadores moleculares, a avaliação de variabilidade genética passou a ser através da utilização de diferentes marcadores moleculares que são independentes de fatores ambientais e representam a variação genética dentro do DNA.

Entre as diferentes técnicas de marcadores de DNA, RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), é a técnica mais fácil e sensível e não utiliza marcação radioativa, com a vantagem de requerer pequenas quantidades de DNA (Williams *et al.*, 1990). Outro fator

importante está na amplitude de alcance destes marcadores que cobrem o genoma inteiro (Ferreira & Grattapaglia 1998). A eficiência dos marcadores RAPD em avaliar variabilidade em tomates foi comprovada por Saliba-Colombani *et al.*, (2000) que observou duas vezes mais polimorfismo com RAPD que com AFLP e RFLP e por Foolad *et al.*, (1993) que observou em RAPD maior eficiência em revelar polimorfismo comparado a RFLP. Os marcadores RAPD têm sido usados com sucesso para estudos de evolução e relacionamento genético entre cultivares modernos, cultivares antigos e formas selvagens de muitas espécies, incluindo o tomate (Williams & St. Clair, 1993; Rojas *et al.*, 1994; Villand *et al.*, 1998; Noli *et al.*, 1999).

Hoje, na região da Serra Gaúcha, o tomate cultivado pode ser separado em dois grupos: um formado por materiais antigos ou crioulos mantidos por pequenos agricultores, os quais vem sendo mantidos no banco de germoplasma do Centro Ecológico de Ipê consolidado através de mais de 20 anos de coleta e resgate de sementes na região nordeste do Rio Grande do Sul, e o outro por cultivares e híbridos comercializados por companhias de semente e importadoras.

Apesar de seu potencial como fonte de variabilidade, a falta de informação sobre sua origem, genealogia, constituição genética e características agronômicas, tem limitado o seu uso em programas de melhoramento genético. A avaliação de similaridade genética pode contribuir para o planejamento racional de programas de melhoramento, para otimizar a gestão de banco de germoplasma (Paterson *et al.*, 1991) e selecionar materiais para projetos de ampliação da base genética (Saavedra *et al.*, 2001).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar o relacionamento genético entre as cultivares comerciais e materiais crioulos, através de dados de marcadores RAPD, com o intuito de contribuir na manutenção do germoplasma e auxiliar em programas de melhoramento de *L. esculentum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico. No presente trabalho foram utilizados 35 acessos de *L. esculentum*, sendo 23 acessos crioulos, pertencentes ao banco de germoplasma do Centro Ecológico de Ipê consolidado através de mais de 20 anos de coleta e resgate de sementes crioulas na região nordeste do Rio Grande do Sul, e 12 cultivares comerciais que foram doadas pelas empresas Feltrin e ISLA, os mais cultivados nesta região (Tabela 1).

Extração de DNA. O DNA genômico foi extraído seguindo o método descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações: 5 plântulas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino; 2.0g deste pó foram transferidas para tubos Eppendorf, adicionado tampão de extração CTAB 2% (1,4 M NaCl, 20 mM de EDTA, 0,2 % de 2-ME, 100mM de Tris-HCl pH 8.0), desproteínizado com clorofil (clorofórmio álcool isoamílico 42:1), precipitado com isopropanol (2/3 do volume), ressuscitado em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 1mM EDTA) e tratado com RNase.

Reação de Amplificação. Utilizou-se a reação de Williams *et al.* (1991), com algumas modificações: Tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl); 2,5 % Triton-X 100, dNTPs (200 µM de cada), 0,2µM de *primer*, 3 mM de MgCl₂, 2 a 4 ng/µl de DNA e 0,02 U/µl de Taq DNA polimerase. Os *primers* utilizados foram da OPERON (10 OPA e 10 OPX). Amplificação foi realizada em termociclador MJ Research INC., Watertown, MA, USA. com a seqüência de 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C, 3 min a 72°C e resfriamento a 4°C.

Tabela 1. Lista dos trinta e cinco acessos de tomate (*L. esculentum*) utilizados neste estudo.

Dados da planta			Dados morfológicos do fruto			
Acessos	tipo	Crescimento.**	No.lóculos	Tamanho*	cor	Formato
Cereja 1	crioulo	I	2	2	amarelo	redondo
Cereja 2	crioulo	I	2	2	vermelho	oblongo
Cereja 3	crioulo	I	2	1	vermelho	redondo
Cereja 4	crioulo	I	2	2	vermelho	oblongo
Cereja 5	crioulo	I	4	2	vermelho	globular
Cereja 6	crioulo	I	2	2	vermelho	oblongo
Cereja 7	crioulo	I	2	2	amarelo	piriforme
Cereja 8	crioulo	I	2	2	vermelho	oblongo
Gáucho 1	crioulo	I	>8	5	vermelho	globular
Gáucho 2	crioulo	I	>8	5	vermelho	globular
Gáucho 3	crioulo	I	>8	5	vermelho	globular
Gáucho 4	crioulo	I	>8	5	laranja	globular
Paulista 1	crioulo	I	4	3	amarelo	oval
Paulista 2	crioulo	I	2	3	vermelho	oval
Paulista 3	crioulo	I	2	3	vermelho	oval
Paulista 4	crioulo	I	2	3	vermelho	oval
Coração de boi 1	crioulo	I	>8	5	vermelho	coração
Coração de boi 2	crioulo	I	>8	5	vermelho	coração
Coração de boi 3	crioulo	I	>8	5	vermelho	coração
Pimentão 1	crioulo	I	2	4	vermelho	oblongo
Pimentão 2	crioulo	I	2	4	vermelho	oblongo
Pimentão 3	crioulo	I	4	5	vermelho	oblongo
Pimentão 4	crioulo	I	2	5	vermelho	oblongo
Polka Baixa	híbrido	II	>4	4	vinho	globular
Itapuá	híbrido	I	2 - 3	3	vermelho	globular
Rasteiro R.G.	cultivar	I	2	3	vermelho	oval
Marglobe	cultivar	I	>6	3	vermelho	globular
Yuba	cultivar	II	2 - 3	3	vermelho	oval
Mountain Pride	híbrido	II	>6	4	vermelho	oval
Marmande	cultivar	I	>8	3	vermelho	globular
Jumbo	cultivar	I	2 - 3	3	vermelho	redondo
Santa Cruz	cultivar	I	2	3	vermelho	oval
Santa Adélia	cultivar	I	2	3	vermelho	retangular
Gáucho	cultivar	I	>8	5	vermelho	globular
Santa Clara	cultivar	I	2	3	vermelho	globular

*(1) muito pequeno (<3cm); (2) pequeno (3-5cm); (3) médio (5.1-8cm); (4) grande (8.1-10cm); (5) muito grande (>10cm). ** I- indeterminado, II- determinado.

Análise eletroforética dos fragmentos amplificados. A separação eletroforética dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE (Trisma, ácido bórico e EDTA), em cuba de eletroforese horizontal com voltagem constante de 90 volts. Como marcador de peso molecular, foi utilizado fago Lambda, clivado com HindIII e EcoRI. Os fragmentos foram corados com brometo de etídio e fotografados.

Análise de dados. Os perfis de RAPD foram avaliados visualmente considerando-se 1 (um) para presença e 0 (zero) para ausência. Para a matriz de dados, foram considerados, somente fragmentos com tamanho superior a 100 pb e inferior a 5000 pb e consistentes em duas repetições independentes e fragmentos que não apresentaram boa definição não foram incluídos. A matriz binária obtida pela análise dos perfis foi utilizada para o cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard. A associação entre os 35 acessos foi revelada através de análise de agrupamentos pelo método UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) e análise canônica discriminante. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional SPSS 10.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). A confiabilidade do dendrograma gerado foi avaliada através de 100 permutações utilizando o programa WinBoot (Yap and Nelson, 1996) e análises da AMOVA foram realizadas com o programa GenAlEx (Peakall and Smouse, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 35 acessos de tomate (*L. esculentum*) 12 cultivares comerciais e 23 materiais crioulos da região sul foram avaliados através de RAPD, usando 20 *primers* decaméricos. Cada *primer* produziu bandas de intensidade variáveis, facilmente detectadas e bandas inespecíficas que foram ignoradas. As bandas utilizadas na análise foram aquelas reproduzíveis entre repetições, com

suficiente intensidade para detectar presença ou ausência com confiança (Figura 1). O tamanho das bandas avaliadas variaram de 150 pb a 1800 pb com um tamanho médio de 860 pb. Bandas com mais de 1800 pares de bases e menores que 100 pares de bases não foram consideradas.

O número de bandas amplificadas, por cada *primer* variou de 5 a 25 com média de 12,85 fragmentos (Tabela 2). O número médio de bandas obtidas por *primer* foi semelhante àquelas encontradas por Noli *et al.*, (1999) e maior do que aquele obtido por Villand *et al.*, (1998).

Tabela 2- Número total de *primers* utilizados, suas seqüências, número total de fragmentos, número de fragmentos monomórficos e polimórficos amplificados.

<i>Primer</i>	Seqüência de bases (5'>3')	Total	No. de bandas	
			Polimórficas	Monomórficas
OPX-01	CTGGGCACGA	9	8	1
OPX-03	TGGCGCAGTG	14	14	0
OPX-04	CCGCTACCGA	10	10	0
OPX-11	GGAGCCTCAG	10	8	2
OPX-12	TCGCCAGCCA	6	2	4
OPX-13	ACGGGAGCAA	6	5	1
OPX-14	ACAGGTGCTG	10	9	1
OPX-15	CAGACAAGCC	14	11	3
OPX-17	GACACGGACC	14	8	6
OPX-18	GACTAGGTGG	15	10	5
OPX-19	TGGCAAGGCA	19	11	8
OPA-01	CAGGCCCTTC	24	24	0
OPA-02	TGCCGAGCTG	18	14	4
OPA-03	AGTCAGCCAC	6	2	4
OPA-04	AATCGGGCTG	16	14	2
OPA-05	AGGGGTCTTG	5	0	5
OPA-08	GTGACGTAGG	12	11	1
OPA-09	GGGTAACGCC	13	8	5
OPA-10	GTGATCGCAG	25	24	1
OPA-19	CAAACGTCGG	11	9	2
		257	202	55

Considerando todos os *primers* foram visualizadas 257 bandas, das quais 78,6% foram polimórficas. A porcentagem de bandas polimórficas foi consideravelmente alta quando comparada com os valores obtidos por outros autores em acessos cultivados e acessos de coleções de bancos de germoplasma. Por exemplo, Williams & St. Clair, (1993) obtiveram 64% de bandas polimórficas em 48 acessos entre cultivares, espécies selvagens e vintage, e Noli *et al.*, (1999) que obtiveram 56% de bandas polimórficas em acessos locais e espécies selvagens. O baixo nível de similaridade (bandas monomórficas) indica alta divergência entre os genótipos avaliados.

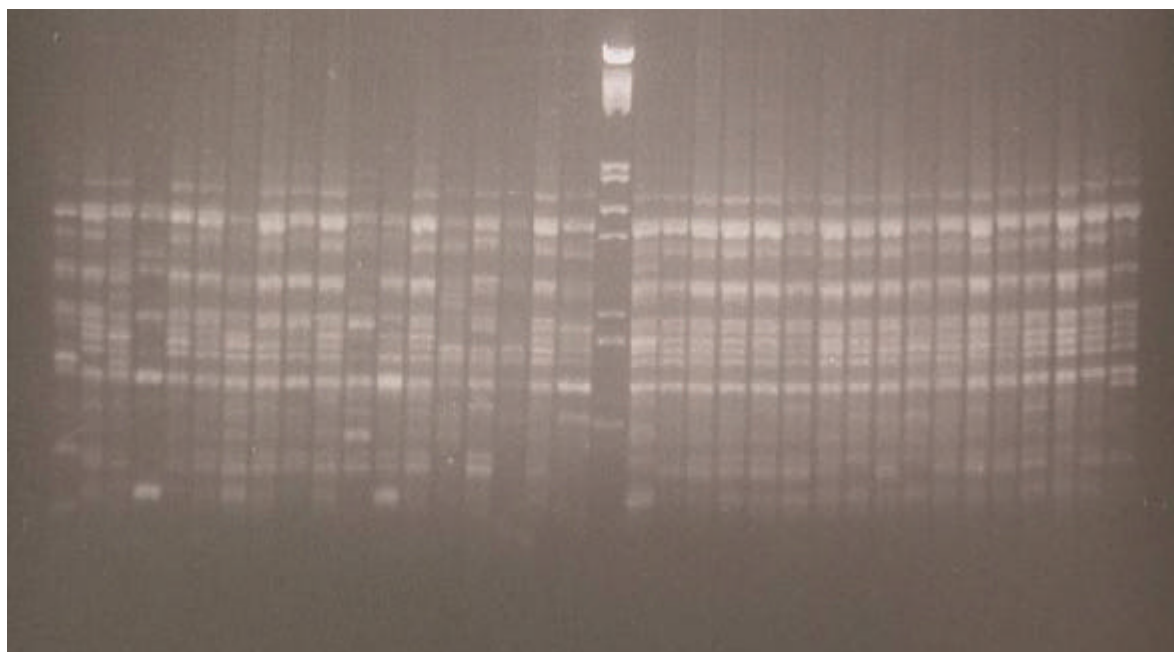


Figura 1. Gel de agarose demonstrativo com amplificação do primer OPX 15 com amostra dos 35 cultivares de tomate.

A porcentagem média da presença de um marcador RAPD foi de 47,6% ($\pm 37,6$). A alta variação observada na porcentagem de distribuição dos marcadores mostra que muitos

marcadores RAPD são amplificados com baixa ou alta frequência (Figura 2). Com exceção de dez produtos de amplificação, não foram observadas diferenças significativas entre a porcentagem média da presença de marcadores de RAPD entre cultivares comerciais e acessos crioulos, indicando que a frequência alta ou baixa dos marcadores é conservada entre os acessos avaliados. Como foi colocado por Villand *et al.*, (1998), estes dados confirmam a necessidade de um número grande de amostras para assegurar a inclusão de alelos de baixa frequência em programas de melhoramento em tomates.

Considerados em conjunto, os 20 *primers* permitiram discriminar todos os possíveis pares de combinações entre os acessos avaliados. Embora algumas bandas foram monomórficas, muitos materiais comerciais e crioulos produziram produto de amplificação singular, que permitiu distinguí-los dos outros dentro dos materiais testados. Estes resultados confirmam a eficiência dos marcadores RAPD para identificação de genótipos de plantas (Weising *et al.*, 1995), e em particular de *Lycopersicon* (Williams & St.Clair, 1993; Rus-Kortekaas *et al.*, 1994; Villand *et al.*, 1998; Noli *et al.*, 1999).

A análise combinada dos fragmentos amplificados gerados pelos *primers* OPX-03, OPX-15 (Figura 1) e OPA-01 foram suficientes para identificar 85% dos genótipos, e o resultado combinado de pelo menos 10 *primers* foi necessário para identificar todos os acessos. Williams and St. Clair, (1993) e Rus-Kortekaas *et al.*, (1994) testando 19 e 15 cultivares, foram capazes de distinguir 94% e 91% das possíveis combinações entre tomates cultivados usando 11 e 4 *primers*, respectivamente.

Os Coeficientes de Similaridade de Jaccard entre as 595 combinações de pares dos acessos variaram de 0,432 a 0,819 com uma média de similaridade genética de 0,654 ($\pm 0,087$). Não foram observadas diferenças significativas entre a média de similaridade genética obtida

pela comparação entre cultivares comerciais e acessos crioulos, indicando que estes dois grupos têm assim uma variabilidade muito semelhante.

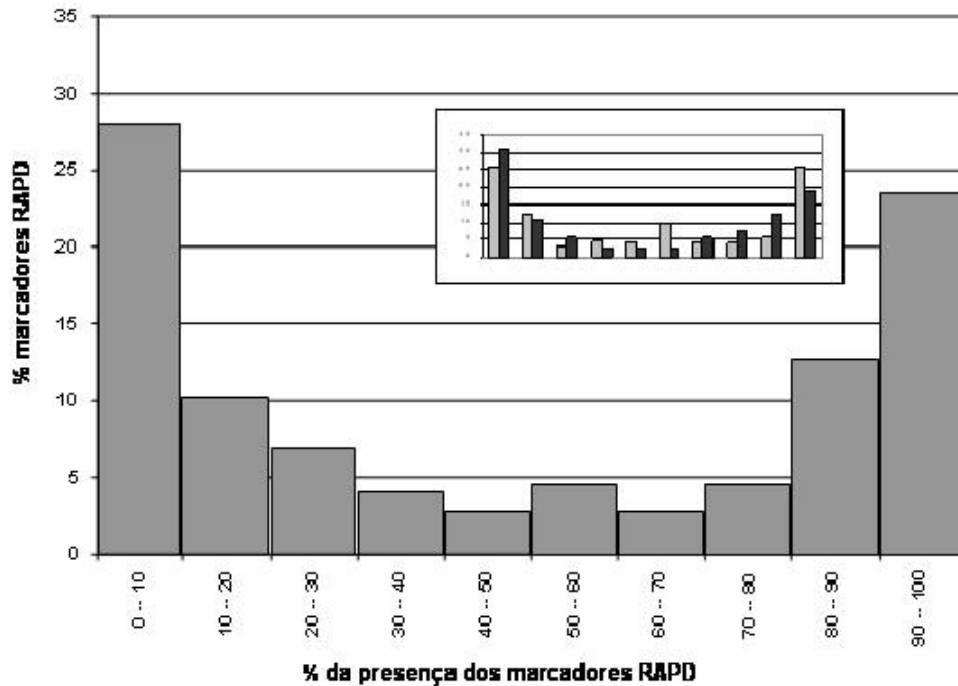


Figura 2. Distribuição da frequência das bandas polimórficos entre os 35 acessos de tomate. Inserção permite comparação da distribuição entre cultivares comercial (cinza) e acessos crioulos (preto).

O dendrograma construído pela análise de agrupamento UPGMA permitiu identificar 7 grupos (Figura 3). Um primeiro grupo, denominado de grupo I, formado por 20 acessos crioulos e 6 cultivares comerciais; um segundo, grupo II, formado pelo cultivar Santa Adélia e o híbrido Polka Baixa; um terceiro, grupo III, formado pela cultivar Marglobe, o híbrido Mountain Pride e o acesso pimentão 2; um quarto, grupo IV, formado pela cultivar Santa Clara; um quinto, grupo V, formado por Cereja 1; um sexto, grupo VI, formado pela cultivar Santa Cruz e o sétimo, grupo VII, formado pelo acesso Paulista 2.

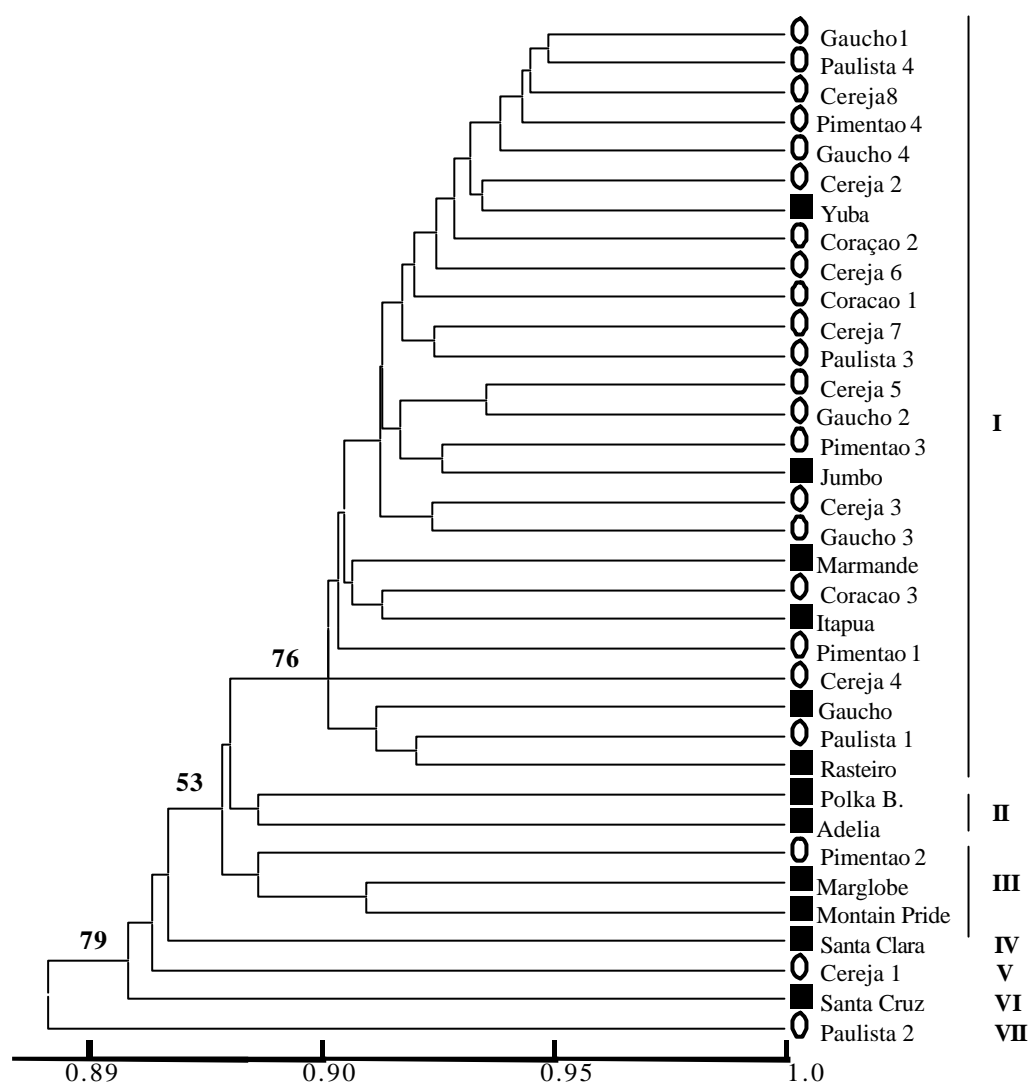


Figura 3. Dendrograma baseado nos índices de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre genótipos de tomate construído por análise de agrupamento (UPGMA).

A grande maioria dos acessos crioulos (20 de 23), ficaram distribuídos no grupo I. Porém as cultivares comerciais distribuíram-se ao longo de todo o dendrograma. A baixa diversidade encontrada dentro dos acessos crioulos pode ser atribuída ou ao efeito fundador que deu origem as espécies domesticadas e ao afinamento da base genética sofrido durante o processo de domesticação e melhoramento do tomate (Rick, 1976; Rick & Yoder, 1988). Por outro lado, a

incorporação de genes oriundos de espécies selvagens e cultivares antigos, têm contribuído no aumento da diversidade genética em cultivares modernos de tomate (Williams & St. Clair, 1993; Noli *et al.*, 1999; Saavedra *et al.*, 2001).

Adicionalmente os resultados da AMOVA e da análise canônica discriminante dos dados de RAPD mostraram que os acessos crioulos e os acessos comerciais utilizados neste trabalho são significativamente diferentes, indicando que os acessos crioulos podem ser uma fonte importante de variabilidade para projetos de alargamento de base genética e programas de melhoramento, contribuindo com alelos raros ou ausentes em cultivares comerciais ou materiais utilizados comumente nos programas.

O gráfico de distribuição com base nas funções discriminantes (Figura 4) permitiu diferenciar os acessos de tomate avaliados de acordo com as características morfológicas dos seus frutos (gaúcho, pimentão, paulista, coração de boi e cereja).

Apesar da distribuição não casual dos marcadores de RAPD no genoma do tomate (Grandillo & Tanksley, 1996; Saliba-Colombani *et al.*, 2000), a relação entre estes marcadores e a morfologia de frutos pode ser considerado indicativo de que as características do fruto são controladas por um grande número de genes, distribuídos pelo genoma. Os resultados apontam também para a possibilidade de utilização dos marcadores RAPD no mapeamento de genes relacionados com estes caracteres, como têm sido previamente utilizados para avaliar genes de precocidade em tomates (Lindhout *et al.*, 1994), entre outros.

Por outro lado, esta associação entre marcadores e morfologia do fruto aponta no sentido de direcionamento dos programas de melhoramento dentro dos distintos grupos de morfologia de frutos, com reduzido intercâmbio de genes entre os mesmos.

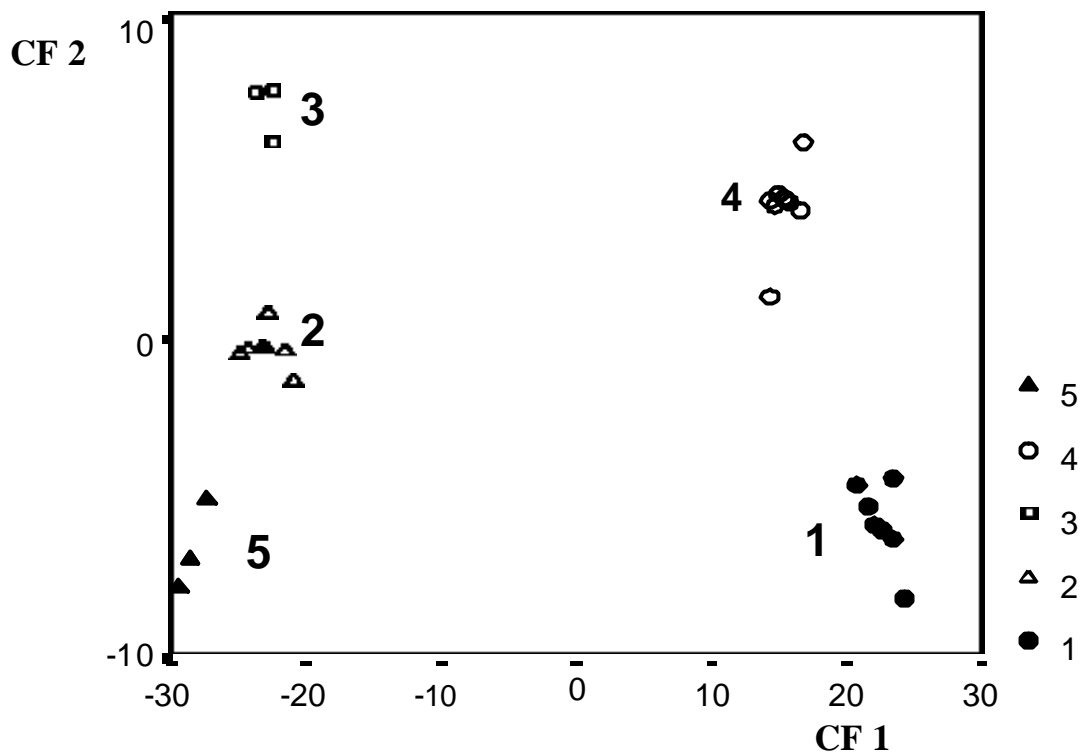


Figura 4. Gráfico de distribuição com base nas funções discriminantes mostrando os 5 grupos concordando com a morfologia dos frutos. 1- tomate gaúcho; 2. – tomate paulista; 3. – tomate coração de boi; 4. –tomate cereja; 5. –tomate pimentão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berg B. M. van den., 1991. A rapid and economical method for hybrid purity testing of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) F1 hybrids using ultrathin-layer isoelectric focusing of alcohol dehydrogenase variants from seeds. *Electrophoresis*, 12: 64-69.
- Chakraborti, A.K., Das, A.K. and Chattopadhyay, N.C., 1992. Identification of some Indian tomato cultivars by polyacrilamide gel electrophoresis of seed proteins. *Seed Research*, 20: 10-13.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 9: 11-15.
- Ferreira M.E., Grattapaglia, D., 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasília.Embrapa-Cenargen, p. 220
- Foolad M. R., Jones R. A., Rodriguez, R. L., 1993. RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Reports*. 12: 293-297.
- Grandillo, S., Tanksley, S. D., 1996. Genetic analysis of RFLPs, GATA, microsatellites and RAPDs in a cross between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.* 92: 957-965.
- Lindhout, P., Heusden, S. V., Pet, G., Ooijen, J. W., Sandbrink, H., Verkerk, R., Vrielink, R., Zabel, P., 1994. Perspectives of molecular marker assisted breeding for earliness in tomato. *Euphytica* 79: 279-286.
- Miller, J.C., Tanksley, S.D., 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 437-448.
- Noli, E., Conti, S., Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., 1999. Molecular characterization of tomato cultivars. *Seed Sci. & Techn.* 27: 1-10.

- Paran, I., Horowitz, M., Zamir, D. and Wolf, S., 1995. Random amplified polymorphic DNA markers are useful for purity determination of tomato hybrids. *HortScience*, 30, 377.
- Paterson A. H., Damon, S., Hewitt, J. D. Radinowich, H. D., Lincoln, E. S., Lander, E. S., Tanksley, S. D., 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: Comparison across species generations and environments. *Genetics*, 127: 181-197.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2001. GenAlEx V5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx>
- Rick, C. M., 1976. Tomato. In: Simmonds, N.W. (ed) *Evolution of crop plants*, Longman, London, pp 269-273.
- Rick, C. M., 1991. Tomato paste: A concentrated review of genetic highlights from the beginning to the advent of molecular genetics. *Genetics*, 128: 1-5.
- Rick, C. M., Forbes, J. F., 1974. Association of an allozyme with nematode resistance. Report of Tomato Genetic Cooperative, pp. 24- 25.
- Rick C.M., Yoder, J. I., 1988. Classical and molecular genetics of the tomato: highlights and prospects. *Annu. Ver. Gen* 22:281-300.
- Rojas, R., Corona, B., Rivas, J. D., 1994. RAPD y polimorfismo genético. *Cultivo Tropicales*. 15 (1) 82-84.
- Rus-Kortekaas, W., Smulders, M.J.M., Arens, P., Vosman, B., 1994. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 37: 375-381.
- Saavedra, G., Spoor, W, Harrier, L., 2001. Molecular markers and genetic base broadening in *Lycopersicon* spp. *Acta Hort*. 546: 503-507.

- Saliba-Colombani, V., Cousse, M., Gervais, L., Philouse, J., 2000. Efficiency of RFLP, RAPD, and markers for the construction map of the tomato genome. *Genome* 43: 29-40.
- Villand, J., Skroch, P.W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C.G., Niemhuis, J., 1998. Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Sci.* 38: 1339-1347.
- Wang, X.F., Knoblauch, R. and Leist, N., 2000. Varietal discrimination of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. *Seed Science and Technology*, 28: 521-526.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, L, Meyer, W., 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Williams, C.E., St. Clair, D.A., 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome* 36: 619-630.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. L., Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Yap, I., Nelson, R.J., 1996. WinBoot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI Discussion Paper Series No. 14, International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila, Philippines.

6. AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A TRÊS ESPÉCIES DE *MELOIDOGYNE* (*M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita*) E PRESENÇA DO GENE Mi EM ACESSOS CRIoulos E CULTIVARES COMERCIAIS DE *L. esculentum* Mill. DO SUL DO BRASIL

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A TRÊS ESPÉCIES DE *MELOIDOGYNE* (*M. javanica*,
M. arenaria e *M. incognita*) E PRESENÇA DO GENE Mi EM ACESSOS CRIoulos E
CULTIVARES COMERCIAIS DE *L. esculentum* Mill. DO SUL DO BRASIL**

Bernardete Primieri Carelli¹, Lee Tseng Sheng Gerald¹, Daniel Gatti², Sergio Echeverrigaray²

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Via Anhanguera, Km174,
Caixa Postal 153, Araras SP, Brasil

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas,1130,
Caxias do Sul, 95001-970, RS Brasil

ABSTRACT

Thirty five tomato accessions, including 12 commercial cultivars and 23 landraces from South Brazil, were evaluated for the resistance to root-knot nematodes, and for the presence of the Mi resistance gene. The results showed that 33 accessions were susceptible to the three *Meloidogyne* species evaluated (*M. javanica*, *M. incognita*, and *M. arenaria*), one of the cultivars (Polka Baixo) was resistant to the three species, and one (Gaúcho) exhibited resistance to *M. incognita*. The PCR evaluation of Mi genes showed that the Mi1.2 gene was present only in the resistant cultivar Polka Baixo, whereas the Mi1.1 gene was present in this cultivar and in other 26 accessions. These data confirms Mi1.2 gene as a resistance determinant, inefficiency of Mi1.1 gene, and the presence of more than one gene of the Mi family in a single tomato accession. The absence of Mi1.2 gene in the *M. incognita* resistant cultivar Gaúcho can be seen as an indicative of the existence of other genes involved in root-knot nematode resistance in *L. esculentum*.

Keywords: Mi gene, *Lycopersicon esculentum*, PCR, root-knot nematodes, *Meloidogyne*.

RESUMO

Trinta e cinco acessos de tomate, incluindo 12 cultivares comerciais e 23 acessos crioulos do Sul do Brasil, foram avaliados para resistência a nematóides, e para a presença do gene de resistência Mi. Os resultados mostraram que 33 acessos foram suscetíveis as três espécies de *Meloidogyne* avaliadas (*M. javanica*, *M. incognita*, e *M. arenaria*). Um dos cultivares, o Polka Baixo, foi resistente às três espécies, e o cultivar Gaúcho apresentou resistência a *M. incognita*. A avaliação através de PCR dos genes Mi mostrou que o gene Mi 1.2 está presente unicamente na cultivar resistente Polka Baixo, enquanto que o gene Mi 1.1 está presente neste cultivar e em outros 26 acessos avaliados. Estes dados confirmam o gene Mi 1.2 como sendo responsável pela resistência a *Meloidogyne* em tomate e a ineficiência do gene Mi 1.1, bem como a presença de mais de um gene da família Mi num mesmo acesso de tomate. A ausência do gene Mi 1.2 no cultivar Gaúcho resistente a *M. incognita* pode ser aceita como indicativo da existência de outros genes envolvidos na resistência a nematóides das galhas em *L. esculentum*.

Palavras chaves: gene Mi, *Lycopersicon esculentum*, PCR, nematóide das galhas, *Meloidogyne*.

INTRODUÇÃO

Os nematóides são endoparasitas obrigatórios, cosmopolitas, que infestam espécies vegetais cultivadas em varias partes do mundo, causando grandes danos na produção de alimentos (Williansom & Hussey, 1996). Estes organismos pertencem ao gênero *Meloidogynes* e são conhecidos como nematóides das galhas da raiz por se alojarem nas raízes das plantas formando pequenos nódulos. As espécies mais importantes economicamente são *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. incognita* que são encontradas isoladamente ou mistas, e nas áreas com ocorrência simultânea das espécies *M. incognita* e *M. javanica* os danos são mais significativos (Charchar, 1995).

A infestação ocorre pela entrada de fêmeas na raiz e sua migração para o cilindro vascular e ali iniciam uma série de mudanças celulares obstruindo a absorção de água e nutrientes pela planta (Milligan *et al.*, 1998). As conseqüências causados pela infestações incluem, principalmente, redução na produtividade e suscetibilidade a outras doenças (Willianson, 1998). Em casos graves de infestação as perdas da produção na tomaticultura podem chegar até 85% em solos altamente contaminados (Lordello, 1981).

Embora os nematóides das galhas da raiz tenham uma série ampla de hospedeiros, muitas espécies cultivadas e nativas apresentam resistência a estes organismos (Roberts, 1995). Apesar do tomateiro ser considerado hospedeiro natural dos nematóides do gênero *Meloidogynes*, algumas variedades de tomates apresentam resistência contra as três maiores espécies de nematóides *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* (Xu *et al.* 2001), e foi do *M. incognita* que derivou o nome do gene de resistência, gene Mi (Roberts & Thomason, 1986).

Por causa dos severos danos causados pelos nematóides na tomaticultura, a incorporação de resistência a nematóides tornou-se prioridade em muitos programas modernos de

melhoramento em tomates (Willianson *et al.*, 1994). O gene de resistência a nematóides das galhas em tomate é um exemplo clássico de hospedeiro resistente que elimina a aplicação de nematicidas na tomaticultura (Medina-Filho & Tanksley, 1980).

A resistência a nematóides do gênero *Meloidogyne* foi introduzida em *L. esculentum* antes dos anos 40, por hibridização interespecífico com *L. peruvianum*, seguida por recuperação de embriões (Smith, 1944). Segundo Medina-Filho & Tanksley (1980), estas plantas híbridas são a fonte de toda a resistência a nematóides das galhas da raiz dentro das linhas de tomate modernas cultivadas.

Hoje, na região da Serra Gaúcha, o tomate cultivado pode ser separado em dois grupos: um por cultivares e híbridos comercializados por companhias de semente e importadoras, e o outro formado por materiais antigos ou crioulos mantidos por pequenos agricultores, os quais vem sendo coletados e distribuídos pelo Centro Ecológico de Ipê, consolidado através de mais de 20 anos de coleta e resgate de sementes na região nordeste do Rio Grande do Sul. Segundo relatos dos agricultores que plantam os materiais crioulos, eles não têm perdas por infestação de nematóides das galhas da raiz em suas lavouras diferente, do que ocorre em lavouras de cultivo convencional. Este fato pode ser atribuído à resistência dos cultivares crioulos ou a efeito direto do sistema de cultivo empregado.

Neste contexto, este trabalho teve com o objetivo avaliar a capacidade de resistência das espécies de tomates crioulos e comerciais da Região Sul, a três espécies de nematóides do gênero *Meloidogynes*, consideradas de maior ocorrência, e verificar a presença do gene Mi através de PCR com *primers* flanqueadores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico. No presente trabalho foram utilizados 35 acessos de *L. esculentum*, sendo 23 acessos crioulos, pertencentes ao banco de germoplasma do Centro Ecológico de Ipê, consolidado através de mais de 20 anos de coleta e resgate de sementes crioulas na região nordeste do Rio Grande do Sul, e 12 cultivares comerciais que foram doadas pelas empresas Feltrin e ISLA, os mais cultivados nesta região (Tabela 1).

Preparo do inóculo. Mudanças de tomate Santa Cruz infestada com cada uma das 3 espécies de nematóides *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* previamente identificadas por eletroforese utilizando-se a técnica de análise eletroforética de isoenzimas (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). Para o preparo do inóculo seguiu-se a metodologia descrita por Hussey & Balker (1973) que consiste em: o sistema radicular de 20 plantas de tomate Santa Cruz com 60 dias de infestação, contendo galhas e massas de ovos foram lavadas e picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador, na rotação máxima, durante 15 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (água sanitária com 2 a 5% de cloro ativo). Após a trituração a mistura foi passada por um conjunto de peneiras, (20 Mesh, 200 Mesh e 500 Mesh). O material contendo ovos e larvas J2 foi lavado abundantemente com água da torneira para retirar o excesso de hipoclorito e transferido para um Becker com auxílio de pipeta com água até atingir o volume de 200 ml. A contagem foi realizada em lâmina de Peter, com 3 repetições e calculada a média do número de ovos e larvas por ml. O processo foi realizado separadamente para cada das três espécies de nematóides.

Tabela 1- Os 35 acessos de tomates *Lycopersicon esculentum* incluídos neste trabalho.

acessos de tomate	Materiais	acessos de tomate	Materiais
Cereja 1	crioulo	Coração de boi 3	crioulo
Cereja 2	crioulo	Pimentão 1	crioulo
Cereja 3	crioulo	Pimentão 2	crioulo
Cereja 4	crioulo	Pimentão 3	crioulo
Cereja 5	cultivar	Pimentão 4	cultivar
Cereja 6	crioulo	Polka Baixa	comercial
Cereja 7	crioulo	Itapuã	comercial
Cereja 8	crioulo	Rio Grande	comercial
Gaúcho 1	crioulo	Marglobe	comercial
Gaúcho 2	crioulo	Yuba	comercial
Gaúcho 3	crioulo	Montain Pride	comercial
Gaúcho 4	crioulo	Marmande	comercial
Paulista 1	crioulo	Jumbo	comercial
Paulista 2	cultivar	Santa Cruz	comercial
Paulista 3	crioulo	Santa Adélia	comercial
Paulista 4	crioulo	Gaúcho	comercial
Coração de boi 1	crioulo	Santa Clara	comercial
Coração de boi 2	crioulo		

Preparo das mudas e inoculação. As sementes dos 35 acessos de tomate foram germinadas em bandejas de poliestireno expandido (128 células), contendo substrato autoclavado e mantidas em casa de vegetação, livres de contaminação até obterem o tamanho de 10 cm de altura. As mudas dos 35 acessos de tomate foram transplantadas para vasos individuais com capacidade de 1 Kg de solo enriquecido com húmus e turfa autoclavado. Plantas com 15 cm de altura foram inoculadas individualmente com 5000 ovos de nematóides seguindo-se a metodologia descrita por Hussey & Barker, (1973) citados por Tihohod, (1989). Cinco plantas de cada acesso de tomate foram infestadas individualmente por cada uma das espécies de nematóide. A inoculação foi realizada através de uma perfuração de aproximadamente 1 cm no solo, junto à planta e vertido o inóculo. Após 45 dias de inoculação foi avaliado o número de galhas existentes no sistema radicular. Para

a contagem de galhas foram atribuídas notas de 0 a 5 conforme a tabela 2, seguindo a metodologia descrita por Taylor & Sasser (1978).

Tabela 2. Atribuição do grau e tipo de reação para cada sistema radicular a ser avaliado.

Grau ou nota	reação	Número de galhas
0	Resistente	0
1	Resistente	1-2
2	Resistente	3-10
3	Suscetível	11-30
4	Suscetível	31-100
5	Suscetível	>100

Extração de DNA. As sementes dos 35 acessos de tomate foram germinadas e crescidas *in vitro* para evitar contaminação do tecido foliar por outros organismos. O DNA genômico foi extraído seguindo o método descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações: 5 plântulas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino; 2.0g deste pó foram transferidas para tubos Eppendorf, adicionado tampão de extração CTAB 2% (1,4 M NaCl, 20 mM de EDTA, 0,2 % de 2-ME, 100mM de Tris-HCl pH 8.0), desproteínizado com clorofil (clorofórmio álcool isoamílico 42:1), precipitado com isopropanol (2/3 do volume), ressuspensionado em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 1mM EDTA) e tratado com RNase.

Reação de amplificação. A reação de amplificação foi realizada em 25 µl de volume contendo: tampão de reação (10mM de TrisHcl pH 8.3; 50 mM de KCl); 3 mM de MgCl₂; 0,25% de triton X-100; 1,25 mM de cada dNTP; 1,25 µl de cada *primer*; 0,3µl de Taq Polimerase e 30ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research modelo PTC100, programado para 10' a 92C° abertura inicial das fitas de DNA e trinta ciclos de 1' a 92C° para

abertura das fitas de DNA; 2' a 58C° para anelamento dos *primers* e 1' a 72C° para extensão das fitas complementares, 10' a 72C° para alongamento complementar das moléculas e resfriamento a 4C° até a aplicação das amostras. Foram utilizados dois *primers* flanqueadores: C1S1 'CCCAGCAAAGTACAATCTAC' para amplificar o fragmento correspondente ao gene Mi1.1 e C2S2 'CTAAGAGGAATCTCATCACAGG' para amplificar o fragmento correspondente ao gene Mi1.2 e o *primer* C2/2 'TCTTGTAAGTTGCGAGTGC', comum aos dois fragmentos, Mi1.1 e Mi1.2, utilizados por Milligan *et al.* (1998).

Análise eletroforética dos fragmentos amplificados. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,5% em Tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M de Ácido bórico e 0,008M EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90Volts. Como marcador de peso molecular foi utilizado o de DNA do fago Lambda, clivado com as enzimas HindIII e EcoRI. A visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e avaliados visualmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação do teste de resistência mostraram que 33 dos 35 acessos testados foram suscetíveis as três espécies de *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*) e dois acessos apresentaram resistência (Tabela 3). O acesso cultivar comercial híbrido Polka Baixo apresentou resistência para as três espécies de nematóides testadas, confirmando a presença do gene de resistência Mi (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Veremis *et al.*, 1999; Rick & Olson, 1999; Adu-Gharbieh *et al.*, 1977, que também verificarem

resistência total em teste realizado com cultivares portadores da resistência. Testes realizados com plantas modificadas geneticamente mostraram que a resistência está ligada à presença do gene Mi1.2 (Hwang *et al.*, 2001).

O outro material que apresentou resistência foi o cultivar Gaúcho (Feltrin). Este cultivar apresentou resistência a *M. incognita*, porém mostrou-se suscetível a *M. javanica* e *M. arenaria*. Estes dados, aparentemente contraditórios, também foram observados por Xu *et al.*, (2001) em cultivares resistentes que foram infestados por isolados de nematóides virulentos de populações coletadas a campo, e por Adu-Gharbieh *et al.*, (1977), que observou susceptibilidade a isolados locais de *Meloidogyne* por parte de materiais resistentes. Tal comportamento foi atribuído a diferenças entre as populações de nematóides utilizadas no processo de melhoramento e aquelas por eles utilizadas.

O cultivar Gaúcho, em teste anterior realizado com população mista de *Meloidogyne* (*M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. hapla*), apresentou resistência total (Carelli *et al.*, 2002). Este fato pode ter ocorrido devido à competição das espécies pelo hospedeiro e/ou indução de resistência a espécies virulentas pelo ataque de espécies não virulentas presentes na mistura.

Os acessos crioulos foram todos suscetíveis indicando que a ausência de infestação nas lavouras ecológicas não é devido a resistência dos materiais, mas possivelmente a condição de cultivo. Para verificarmos as informações foi realizado um teste em 3 propriedades de cultivo ecológico. Foram transplantadas cinco mudas de tomate da variedade Santa Cruz, cultivar utilizada amplamente como planta armadilha para determinação da presença de *Meloidogyne*. As mudas foram distribuídas ao acaso no meio do plantio de tomate. Após 60 dias as mudas foram colhidas e seu sistema radicular observado. Não foram encontradas galhas em nenhuma das mudas plantadas nas 3 propriedades, indicando a ausência de *Meloidogyne* nestas áreas. Considerando a alta frequência destes nematóides, na Região Sul (Pauletti *et al.*, 2000), tal

ausência pode ser atribuída ao equilíbrio ecológico do solo destas propriedades de cultivo ecológico (Primavesi, 1985). Nestas áreas a rotação de cultura é uma prática comum e plantas com princípios nematecidas tais como: nabo forrageiro (*Brassica napus*) e mucuna preta (*Mucuna aterrima*), são utilizados como cobertura vegetal (Ferraz e Costa do Valle, 1997).

Tabela 3. Infestação de *Meloidogynes* (*M. javanica*, *M. incognita* *M. arenaria*) nos 35 acessos de tomates.

Tomate	<i>M. javanica</i> .	<i>M. incognita</i>	<i>M. arenaria</i>
Acesso	Reação	reação	reação
Cereja 1	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Cereja 2	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Cereja 3	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Cereja 4	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Cereja 5	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Cereja 6	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Cereja 7	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Cereja 8	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Pimentão 1	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Pimentão 2	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Pimentão 3	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Pimentão 4	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Gaúcho 1	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Gaúcho 2	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Gaúcho 3	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Gaúcho 4	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Gaúcho	Suscetível	resistente	Suscetível
Coração de boi 1	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Coração de boi 2	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Coração de boi 3	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Paulista 1	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Paulista 2	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Paulista 3	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Paulista 4	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Polka Baixo	resistente	Zero	Resistente
Itapuã	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Rio Grande	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Marglobe	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Yuba	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Mountain Pride	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Marmande	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Jumbo	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Santa Cruz	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Santa Adélia	Suscetível	Suscetível	Suscetível
Santa Clara	Suscetível	Suscetível	Suscetível

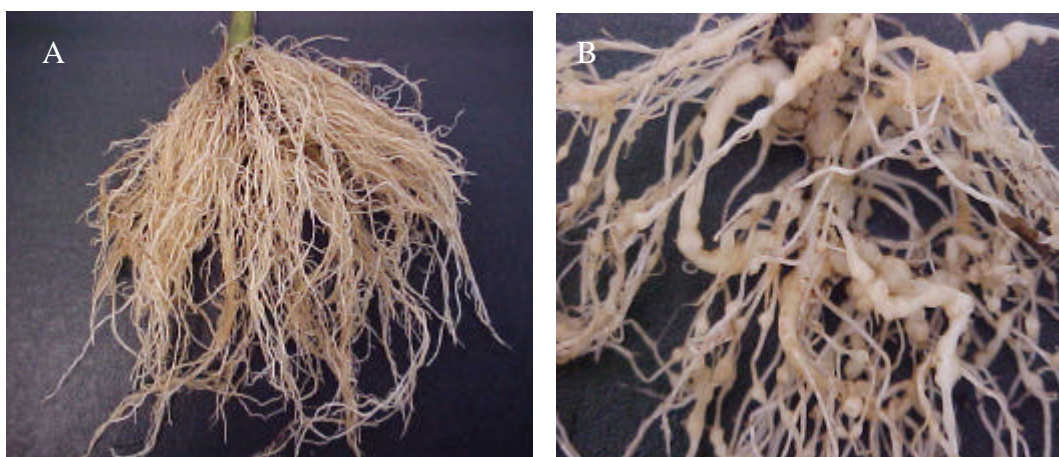


Figura 1. A. Sistema radicular do cultivar Polka Baixo; B. Sistema Radicular do cultivar S.Cruz.

Dos 35 acessos de tomates avaliados por PCR apenas o híbrido comercial Polka Baixo amplificou os dois fragmentos correspondendo ao gene Mi1.1 e ao gene Mi1.2 (Tabela 4). Sua resistência foi comprovada no teste de resistência (Tabela 3). Os outros 34 acessos não amplificaram o fragmento correspondente ao gene Mi1.2, e foram suscetíveis às três espécies de nematóides no teste de resistência (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Milligan *et al.*, (1998) e Wang *et al.*, (2000), e segundo estes autores a presença do gene Mi1.2 é suficiente para assegurar resistência contra as três maiores espécies de nematóides das galhas do gênero *Meloidogyne*.

Para o fragmento correspondente ao gene Mi1.1, apenas 27 acessos, incluindo acessos cerejas 1, 2, 3, 6, 7 e 8; acessos Pimentões 1, 3 e 4; acessos Gaúchos 1, 2, 3 e 4; acessos paulistas 1 e 4; e 11 dos cultivares comerciais, excluindo o cultivar Santa Cruz, amplificaram o fragmento correspondente e foram suscetíveis às três espécies de nematóides no teste de resistência. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Milligan *et al.* (1998) e Wang *et al.* (2000), que

sugerem que o gene Mi1.1 não é efetivo na resistência aos nematóides, este gene não codificaria uma proteína funcional.

Tabela 4. Relação dos fragmentos amplificação dos genes Mi1.1 e Mi1.2 dos 35 acessos de tomate.

tomate acesso	gene Mi 1.1	gene Mi 1.2	tomate acesso	gene Mi 1.1	gene Mi 1.2	tomate acesso	gene Mi 1.1	gene Mi 1.2
Cereja 1	X	-	Gaúcho 1	X	-	Polka Baixo	X	X
Cereja 2	X	-	Gaúcho 2	X	-	Itapuã	X	-
Cereja 3	X	-	Gaúcho 3	X	-	Rasteiro	X	-
Cereja 4	-	-	Gaúcho 4	X	-	Marglobe	X	-
Cereja 5	-	-	Gaúcho	X	-	Yuba	X	-
Cereja 6	X	-	Coração de boi 1	-	-	M. Pride	X	-
Cereja 7	X	-	Coração de boi 2	X	-	Marmande	X	-
Cereja 8	-	-	Coração de boi 3	X	-	Jumbo	X	-
Pimentão 1	X	-	Paulista 1	X	-	Santa Cruz	-	-
Pimentão 2	-	-	Paulista 2	-	-	S. Adélia	X	-
Pimentão 3	X	-	Paulista 3	-	-	Santa Clara	X	-
Pimentão 4	X	-	Paulista 4	X	-			

A exceção ficou por conta do cultivar comercial Gaúcho que no teste de resistência, apresentou resistência ao *M. incognita* e não amplificou o fragmento correspondente ao gene Mi.1.2, porém amplificou o fragmento correspondente ao gene Mi 1.1. Considerando que Mi 1.1 não está envolvido na resistência, a tolerância observada neste cultivar pode estar relacionada à presença de outros genes da família Mi, ainda não identificados, ou de expressão transitória de genes de defesa envolvidos na resistência a nematóides conforme sugerido por Willianson (1998).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adu-Gharbieh , W. I., 1977. Population dynamics and effect *Meloidogyne incognita* (nematodes) on different plantings of tomato in the Central Jordan Valley. *Nematol-Mediterr.* 5(2):227-232.
- Carelli, B. P., Gerald, L. T. S., Echeverrigaray, S., Pauletti, G. F., 2001. Avaliação do grau de tolerância de genótipos de tomate à infestação por nematóides. *Horticultura Brasileira.* V. 19 Suplemento, CD-ROM, Junho 2001.
- Charchar, J. M., 1995. *Meloidogyne* em Hortaliça. Rio Quente, GO. SBN/ONTA. P.149-153.
- Doyle & Doyle, J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul.* 19:11-15.
- Esbenshade, P. R., Triantaphyllou, A. C., 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *J-Nematol.* 17(1):6-20.
- Ferraz, S., Costa do Valle, L. A., 1997. Controle de Fitonematóides por Plantas Antagônicas. UFV. Viçosa. P. 51.
- Hwang, C. F., Bhakta, A. V., Truesdell, G. M., Pudlo, W. M., Willianson, V. M., 2000. Evidence for a Role of the N terminus and Leucine-Rich Repeat of the Mi Gene Product in Regulation of Localized Cell Death. *Plant Cell.* 12:1319-1329.
- Hussey, R.S.; Barker, K.R., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, v. 57, p. 1025-1028,
- Lordello, L.G. E., 1981. Nematóides das plantas cultivadas. São Paulo. Nobel, 314p.
- Medina-Filho, H. P., Stevens, M. A., 1980. Tomato breeding for nematode resistance: Survey of resistant varieties for horticultural characteristic and genotype of acid phosphates. *Acta Hortic.* 100: 383-393.

- Medina-Filho, H., Tanksley, S. D., 1983. Breeding for nematode resistance. *Handb Plant Cell Cult.* 1:904-923.
- Milligan, S.B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabe, L, P., Williamson, V.M., 1998. The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell.* 10:1307-1319.
- Pauletti, G.F., 2000. Nematóides das Galhas em Plantas Aromáticas e Medicinais da Família Lamiaceae. Dissertação de Mestrado: Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia. 58 p.
- Primavesi, A., 1985. Manejo Ecológico do Solo. Ed. Nobel. São Paulo pp. 560.
- Pessoa, H. B. S. V., Carvalho, S. I. C. DE., 1998. Multiplicação, Caracterização e Conservação de Germoplasma de Tomate. Embrapa, comunicado técnico ISSN 1414-9850.
- Rick, C. M., 1983. Genetic variability in tomato species. *Plant Molecular Biology Reporter* 1
- Rick J. R., Olson, S. M., 1999. utility of *Mi* gene resistance in tomato to manage *Meloidogyne javanica* in north Florida. *J. nematol* 31(4):715-718.
- Roberts, P. A., 1995. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematode related host plant resistance. *Annu. Ver. Phytopathol.* 33:199-221.
- Roberts, P. A. , Thomason, I. J., 1986. Variability in reproduction of isolates of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* on resistant tomato genotypes. *Plant. Dis.* 70(6): 547-551.
- Rossi, C. E., Schiavon, A. A., 2002. Reações de genótipos de tomateiro a *Meloidogyne javanica*. *Horticultura Brasileira*, v. 20, n. 2, julho, 2002. Suplemento 2.
- Smith P. G., 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc Am Soc Hort Sci* 44:413-416.

- Taylor, A. L.; Sasser, J. N., 1978. Biology, identification and control of root-Knot nematodes (Meloidogyne sp.) Nort Carolina State University Graphics Raleigh, 111p.
- Tihohod, D., 1993. Nematologia Agrícola Aplicada. 3º Ed. Lavras. ESAL p. 57-77.
- Veremis, J. C., Roberts P. A., 1996. Relationships between *Meloidogyne javanica* in the *Lycopersicon peruvianum* complex. Theor. Appl. Genet. 93: 894-901.
- Wang , X. F., Knoblauch, R., Leist, N., 2000. Varietal discrimination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) by ultrathion-layer isoelectric focusing of seed protein. Seed S & Tecnol. 28:521-526.
- Williams, C.E., St. Clair, D.A., 1993 Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivared and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. Genome 36: 619-630.
- Williamson, V. M., 1998. Root-Knot nematode de resistance genes in tomato and their potencial for future use. Annual-Review-of-Phytopathology. 36: 277-293.
- Williamson, V.m.; Hussey, R.S., 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. Plant.Cell.8:1735-1745.
- Williamson, V. M., Ho, J. Y., Wu, F. F., Muller, N., Kaloshian, I., 1994. A PCR- based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. Theor Appl Genet 87:757-763.
- Xu, J., Narabu, T., Mizukubo, T., Hibi, T., 2001. A Molecular Marker Correlated With Selected Virulence Against The Tomate Resistance Gene MI in *Meloidogyne incognita*, *M. Javanica* end *M arenaria*. The American Phytopathological Society. Vol. 91 N°4 : 377-382.

DISCUSSÃO GERAL

O tomate é uma espécie de origem americana, domesticada pelas populações indígenas, levadas para a Europa durante a colonização, posteriormente reintroduzida na América por imigrantes, inclusive no Brasil, e atualmente comercializada por diversas companhias de sementes. Assim sendo, as populações atuais presentes no Sul do Brasil podem ser separadas em materiais comerciais oriundos de programas de melhoramento brasileiros e estrangeiros, e materiais “crioulos” mantidos por pequenos agricultores, que representam germoplasma oriundo dos materiais introduzido pelos colonizadores, materiais indígenas e materiais derivados de cultivares antigos.

Frente a esta realidade, o estudo da variabilidade genética e a comparação entre os cultivares comerciais e os acessos crioulos podem contribuir para estimar as diferenças genéticas acumuladas durante o processo de melhoramento, a variabilidade geral disponível, e a contribuição potencial dos materiais crioulos na ampliação da variabilidade genética do tomate. Com esta finalidade, marcadores morfológicos e moleculares (protéicos e RAPD) foram utilizados para avaliar 35 acessos, 12 comerciais e 23 acessos crioulos coletados na região serrana do Rio Grande do Sul, e mantidos pelo Centro Ecológico de Ipê.

Como esperado, os acessos crioulos apresentaram ampla variabilidade na morfologia de frutos, incluindo frutos do tipo Cereja, Pimentão, Coração de Boi, Gaúcho e Paulista, enquanto que os materiais comerciais restringiram-se aos grupos mais comuns no mercado, Gaúcho e Paulista. Da mesma forma, outras características, como cor de fruto, forma, acidez e sabor, apresentaram maior variação nos materiais crioulos. A análise de agrupamentos com base nos dados referentes aos caracteres morfológicos avaliados, a maior parte referentes a caracteres de

fruto, confirmaram os cinco grupos de tomates e mostram a existência de variação dentro de cada um deles, especialmente no grupo cereja.

Quanto à produtividade, os materiais comerciais apresentaram média superior aos crioulos. Entretanto, alguns materiais crioulos se sobressaíram (Cereja 6, Gaúcho 2, Coração de Boi 3 e Paulista 1), superando a média nacional de 54,44 t/ha (FAO, 2002), o que mostra o potencial destes para produção comercial e inclusão em programas de melhoramento.

Os perfis eletroforéticos de proteínas totais solúveis de sementes mostraram a ocorrência de baixa variabilidade qualitativa, mas variações quantitativas apreciáveis permitiram a identificação dos 37 materiais avaliados (nestes experimentos foram incluídos dois materiais comerciais experimentais). Os agrupamentos formados através da análise multivariada dos dados qualitativos quantitativos das proteínas de sementes permitiram separar os materiais em cinco grupos, sendo que os materiais comerciais e crioulos não mostraram uma tendência clara de separação, e os agrupamentos formados não apresentaram relação com a morfologia de fruto. De um modo geral, os materiais crioulos apresentaram maior variação nas proteínas de sementes o que pode ser tomado como indicativo de estreitamento da base genética nos materiais comerciais.

De forma análoga, a análise da variabilidade através de marcadores de RAPD, permitiu a identificação de todos os genótipos avaliados, confirmando a eficiência deste tipo de marcador na caracterização de materiais. A análise de agrupamentos permitiu a separação de sete grupos, os quais não apresentaram relação com aqueles formados com base nos perfis protéicos. Por outro lado, análise discriminante mostrou a existência de relação entre os marcadores de RAPD e os grupos de morfologia de fruto. Comparação entre materiais comerciais e crioulos através de análise de AMOVA mostrou diferenças significativas entre estes dois grupos.

Os resultados obtidos tanto com marcadores morfológicos quanto moleculares indicam que os materiais crioulos podem ser uma fonte importante de variabilidade para projetos de

alargamento da base genética e programas de melhoramento, contribuindo com alelos e características raras ou ausentes em cultivares comerciais ou materiais utilizados comumente nos programas.

Uma praga muito importante na cultura do tomateiro é os nematóides formadores de galhas na raiz do gênero *Meloidogyne*, mais particularmente as espécies *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, todas elas encontradas em alta frequência na região serrana do Rio Grande do Sul. Relatos de agricultores e levantamentos realizados mostraram que os cultivos ecológicos de materiais crioulos não apresentam infestação por estes fitoparasitas. Tal constatação levou-nos a testar a resistência ou sensibilidade dos materiais disponíveis (comerciais e crioulos) as três espécies de *Meloidogyne*, assim como a presença do gene Mi, considerado o mais importante fator monogênico responsável pela resistência a estes nematóides. Os resultados obtidos mostraram que todos os materiais crioulos e comerciais, com exceção dos cultivares Polka Baixa e Gaúcho (Feltrin) são sensíveis às três espécies de nematóides utilizadas nos testes, indicando que a ausência de nematóides em plantios ecológicos de materiais crioulos está associada com o sistema de cultivo e não à resistência genética dos tomates utilizados.

O cultivar Polka Baixa apresentou resistência às três espécies de *Meloidogyne*, enquanto que o cultivar Gaúcho (Feltrin) exibiu resistência somente a *M. incognita*, mostrando que a base genética da resistência nestes dois materiais é distinta. Tal diferença foi confirmada através da amplificação específica dos genes Mi1.1 e Mi1.2 no cultivar Polka Baixa, e apenas do gene Mi1.1 no cultivar Gaúcho (Feltrin). Considerando todos os cultivares avaliados, o gene Mi1.2. foi encontrado somente no cultivar Polka Baixo, enquanto o gene Mi1.1 em 26 materiais, a maior parte sensíveis a *Meloidogyne*, confirmando o gene Mi1.2 como determinante de resistência a estes nematóides, e a ineficiência do gene Mi1.1 neste sentido. A ausência do gene Mi1.2 no cultivar Gaúcho (Feltrin) e a sua resistência a *M. incognita* pode ser aceita como indicativo da

existência de outros genes, envolvidos na resistência a nematóides das galhas em *L. esculentum*, ainda pouco estudados e aproveitados.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. As características morfológicas peculiares e a alta produtividade exibida por alguns materiais crioulos indicam que os mesmos apresentam potencial econômico e podem contribuir em programas de melhoramento.
2. Marcadores moleculares (protéicos e de DNA) confirmaram a baixa variabilidade geral em tomate, em especial em cultivares comerciais, mas permitiram a caracterização de todos os materiais avaliados.
3. Não foi constatada relação de similaridade clara entre os perfis protéicos e os grupos de morfologia de fruto, e entre cultivares comerciais e materiais crioulos.
4. Mais de 35% dos marcadores de RAPD foram encontrados em baixas frequências mostrando a ocorrência de alelos raros nos materiais estudados.
5. Análise discriminante diferenciou os acessos de acordo com as características morfológicas dos frutos, mostrando existir relação entre marcadores de RAPD e os grupos de morfologia de fruto.
6. De um modo geral, os dados obtidos com os três tipos de marcadores empregados confirmam a ocorrência de estreitamento da base genética nos materiais comerciais.

7. Apenas dois cultivares dos 35 acessos avaliados mostraram resistência total ou parcial a nematóides das galhas (*Meloidogyne* sp.) fato preocupante considerando a alta incidência destes fitoparasitas nos solos do Sul do Brasil.
8. A sensibilidade dos acessos crioulos associados à ausência de infestação em plantios ecológicos mostra a necessidade de estudos para determinação dos fatores envolvidos no controle de nematóides nestes sistemas de produção.
9. A presença do gene Mi1.1 em acessos sensíveis a *Meloidogyne*, e a presença do gene Mi1.2 unicamente no cultivar resistente Polka Baixo, confirmam o gene Mi1.2 como determinante de resistência a estes nematóides, e a ineficiência do gene Mi1.1 neste sentido.
10. A resistência a *M. incognita* e a ausência do gene Mi1.2 no cultivar Gaúcho (Feltrin) indicam a existência de outros genes, ainda pouco estudados e aproveitados, envolvidos na resistência a nematóides das galhas em *L. esculentum*.