

## Fontes de resistência em acessos de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) a *Verticillium dahliae* raças 1 e 2

Bruno Eduardo C de Miranda<sup>1</sup>; Leonardo S Boiteux<sup>2</sup>; Eduardo M Cruz<sup>2</sup>; Ailton Reis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UnB, Dep<sup>o</sup> Fitopatologia, C. Postal 4457, 70910-900 Brasília-DF; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília-DF; ailton@cnpq.embrapa.br

### RESUMO

A murcha-de-verticílio (*Verticillium dahliae*) é uma das doenças mais severas do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Duas raças fisiológicas de *V. dahliae* foram caracterizadas infectando o tomateiro e ambas estão presentes no Brasil. A estratégia de controle mais efetiva para isolados da raça 1 tem sido a utilização de cultivares resistentes em associação com práticas culturais. Entretanto, não existem cultivares comerciais de tomate resistentes à raça 2 do patógeno. Neste contexto, torna-se importante a identificação de novas fontes de resistência que sejam efetivas contra as duas raças de *V. dahliae*. Buscou-se fontes de resistência a isolados de *V. dahliae* (raças 1 e 2). Cem acessos de uma coleção de germoplasma contendo espécies cultivadas e selvagens de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) foram inicialmente inoculados pelo método de imersão de raízes com um isolado de *V. dahliae* raça 1 (5 mL de uma suspensão de 10<sup>6</sup> conídios/mL) em condições de casa de vegetação. A avaliação foi feita aos 30 dias após a inoculação, usando uma escala de notas variando de 1 (planta sadia) a 5 (planta morta). Foram considerados resistentes os acessos que apresentaram nota média entre 1 e 2. Um grupo composto por 38 acessos classificados como resistentes neste primeiro ensaio foi reavaliado para resistência a outros quatro isolados de *V. dahliae* pertencentes às raças 1 e 2. As cultivares Ponderosa e Floradade foram utilizadas como controles. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação em delineamento experimental de blocos ao acaso em arranjo fatorial 5 x 40, com três repetições (vasos com quatro plantas). A avaliação foi feita baseada nos parâmetros epidemiológicos: período de incubação e índice de doença. Foram identificados acessos com resistência raça-específica e também com resistência a ambas as raças. Estes acessos podem ser indicados para futuros programas de melhoramento genético visando incorporar resistência ampla à doença.

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum*, resistência, melhoramento genético.

### ABSTRACT

**Sources of resistance to *Verticillium dahliae* races 1 and 2 in accessions of *Solanum* (section *Lycopersicon*)**

Verticillium wilt (*Verticillium dahliae*) is one of the most destructive diseases of tomato (*Solanum lycopersicum*). Two *V. dahliae* races have been described infecting tomatoes and both are present in Brazil. The most effective control strategy of *V. dahliae* race 1 isolates is based upon the use of resistant cultivars combined with cultural practices. However, there is so far no fresh-market tomato cultivar available with resistance to *V. dahliae* race 2. Therefore, it is important to identify new sources of effective resistance against both pathogen races. *Solanum* (section *Lycopersicon*) accessions were screened to search for resistance sources to both *V. dahliae* races 1 and 2. A germplasm collection composed by 100 accessions of cultivated and wild tomatoes was first inoculated via root dipping method (5 mL; 10<sup>6</sup> conidia/mL) with one isolate of *V. dahliae* race 1. Disease assessment was done 30 days after inoculation using a disease severity index ranging from 1 (plant without symptoms) to 5 (dead plant). Accessions with average severity index from 1 to 2 were classified as resistant. A subgroup of 38 race 1 resistant accessions was re-evaluated against four isolates of *V. dahliae* belonging to races 1 and 2. The cultivars Ponderosa and Floradade were used as controls. The assay was conducted under greenhouse conditions using a completely randomized, factorial (5 x 40) design with three replicates (three pots with four plants each). Evaluation was done based upon two epidemiological parameters: incubation period and disease severity index. Race-specific and multiple-race resistance sources were identified. The most promising accessions could be useful for breeding purposes aiming to develop cultivars with stable resistance to both races.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, resistance, genetic breeding.

(Recebido para publicação em 22 de julho de 2009; aceito em 15 de outubro de 2010)

(Received on July 22, 2009; accepted on October 15, 2010)

A murcha-de-verticílio (*Verticillium dahliae* Kleb.) é uma das doenças mais destrutivas do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Essa doença é importante tanto no cultivo do tomateiro para consumo *in natura* como para processamento industrial. A murcha-de-verticílio é mais severa em áreas de clima ameno. *Verticillium dahliae* apresenta amplo círculo de plantas hospedeiras, sendo

relatado como parasita de cerca de 200 espécies vegetais, na sua maioria dicotiledôneas (Bhat & Subbarao, 1999). No Brasil, a doença é mais importante nas regiões Sul e no Sudeste do Brasil e em regiões de microclima de altitude, onde severos danos vêm sendo relatados (Reis & Boiteux, 2006a).

A murcha-de-verticílio se tornou, nas últimas décadas, uma doença de

importância secundária devido ao extensivo uso de cultivares resistentes à raça 1 do patógeno. No entanto, o aparecimento e ampla disseminação da raça 2 têm acarretado grandes prejuízos aos produtores brasileiros (Reis & Boiteux, 2006a). Isolados da raça 2 foram inicialmente relatados causando danos esporádicos em tomate para processamento industrial em Pernambuco (Laterrot et

Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

al., 1983); em tomate de mesa em São Paulo (Cerezine *et al.*, 1990) e no Distrito Federal (Santos & Lopes, 1995). No entanto, mais recentemente, diversos surtos epidêmicos foram relatados nas regiões de produção de tomate *in natura* no Sul e Sudeste do Brasil (Reis & Boiteux, 2006a; Reis *et al.*, 2007).

Resistência a isolados de *Verticillium* foi inicialmente identificada em 1932 no acesso *S. lycopersicum* var. *cerasifore* ‘Peru Wild’ (Schaible *et al.*, 1951; Accari *et al.*, 2005). Esta resistência é raça 1-específica, apresentando herança simples, monogênica e dominante (Schaible *et al.*, 1951; Bender & Shoemaker, 1984; Kawchuk *et al.*, 2001). A resistência derivada de ‘Peru Wild’ é condicionada por um locus complexo composto por dois genes *Ve-1* e *Ve-2* que se localizam no cromossomo 9 do tomateiro (Diwan *et al.*, 1999; Kawchuk *et al.*, 2001; Fradin *et al.*, 2009). Dados recentes indicam que o gene *Ve-1* controla a resposta de resistência a *V. dahliae* raça 1 (Fradin *et al.*, 2009).

Algumas das fontes de resistência/tolerância a *V. dahliae* raça 2 foram detectadas em germoplasma de *Solanum* (secção *Lycopersicon*), mas não se mostraram tão efetivas e/ou estáveis quando comparadas com as fontes de resistência relatadas para a raça 1 (Okie & Gardner, 1982). Por exemplo, algumas cultivares identificadas como resistentes à raça 2 do patógeno em outras partes do mundo apresentaram resposta de suscetibilidade quando inoculadas com isolados brasileiros (Santos, 1997). Além disso, existem relatos indicando que o controle genético da resistência para isolados da raça 2 nestas fontes é mais complexo, podendo apresentar herança quantitativa e/ou respostas do tipo “isolado-específica” (Baergen *et al.*, 1993). Mais recentemente, Stamova (2005) relatou uma nova fonte de resistência monogênica dominante para a raça 2. No entanto, esta fonte ainda não foi avaliada nas condições brasileiras.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar um conjunto de acessos cultivados e selvagens do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) quanto à reação à murcha-de-verticílio, buscando identificar novas fontes que combinem resistência às raças 1 e 2 do fungo *V.*

*dahliae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Produção de inóculo de *Verticillium dahliae*:** A produção de inóculo do patógeno seguiu o protocolo descrito por Santos (1997). Um isolado de *V. dahliae* raça 1 (‘Vert. 94’) previamente caracterizado como virulento e agressivo ao tomateiro cultivar ‘Ponderosa’ (Reis *et al.*, 2007) foi cultivado em meio BDA (batata dextrose ágar) + rifampicina (antibiótico) por sete dias. Após este período, retirou-se um disco de 1 mm do meio de cultura com crescimento abundante do micélio e colocou-se em um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL do meio líquido BD. O Erlenmeyer foi mantido por 15 dias em agitador automático a temperatura de (23 ± 2°C) e ausência de luz. Após esta etapa, a suspensão de esporos obtida foi filtrada em gaze dupla e a concentração do inóculo foi ajustada para 10<sup>6</sup> conídios/mL.

**Primeira triagem de acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) com um isolado de *V. dahliae* raça 1:** Em um primeiro ensaio as respostas de acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) a um isolado de *V. dahliae* raça 1 foram avaliadas de acordo com o protocolo descrito por Santos (1997). O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças em Brasília. Foi avaliada uma coleção de 100 acessos de tomateiro do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças. Os acessos que serviram como controles foram as cultivares de tomateiro Ponderosa (suscetível às duas raças) e Floradade (resistente à raça 1, devido à presença do gene *Ve-1*). Os acessos foram semeados em bandejas de poliestireno contendo o substrato Plantmax®. As mudas foram inoculadas quando atingiram o estágio de dois pares de folhas verdadeiras.

**Inoculação e delineamento experimental:** A inoculação foi feita retirando-se as mudas das bandejas, seguida de lavagem das raízes e corte com tesoura de suas extremidades (2 cm). Em seguida, as raízes foram imersas por um minuto na suspensão de conídios em Becker de 100 mL contendo 50 mL da suspensão conidial descrita acima. Após isto, as mudas foram transplantadas para vasos

de 1,5 L contendo substrato esterilizado composto de areia, argila e esterco bovino curtido. Estes vasos haviam sido previamente irrigados até o ponto de saturação. Em seguida, adicionou-se 5 mL da suspensão de conídios ao colo de cada plântula. As plantas não foram irrigadas no dia da inoculação para evitar a perda do inóculo através de escorrimento. As irrigações foram retomadas a partir do segundo dia após a inoculação e, a partir deste ponto, somente quando fosse necessário. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com três repetições (parcelas representadas por um vaso com quatro plantas). A avaliação dos acessos foi feita 30 dias após a inoculação. Observou-se a presença de sintomas externos e escurecimento vascular, verificado através do corte transversal no colo de cada planta. Foi adotada uma escala de notas adaptada de Reis *et al.* (2007) variando de 1 até 5 onde: 1= plantas sem sintomas; 2= plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento foliar, mas com leve escurecimento vascular, limitado à região do colo da planta; 3= plantas com escurecimento vascular ultrapassando a região do colo e/ou com murcha, necrose em “V” ou amarelecimento foliar; 4= plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento, necrose foliar e seca de ramos e 5= plantas mortas. Os acessos que apresentaram notas médias (média das 4 plantas) entre 1 e 2 foram considerados resistentes e aqueles com notas acima de 2 foram arbitrariamente considerados suscetíveis. Os acessos resistentes foram selecionados para serem avaliados quanto à resistência a cinco isolados de *V. dahliae* raças 1 e 2.

**Avaliação da resistência dos acessos selecionados a isolados de *V. dahliae* (raças 1 e 2):** Este segundo experimento visou avaliar a resposta para um grupo maior e mais variado de isolados do fungo dos 38 acessos que apresentaram níveis de resistência promissores no primeiro ensaio. Estes acessos foram avaliados quanto à reação a cinco isolados de *V. dahliae*, sendo três deles pertencentes à raça 1 e dois pertencentes à raça 2. Foram utilizados os seguintes isolados da raça 1: ‘Vert. 02’ (obtido de tomateiro em Botucatu-SP), ‘Vert. 12’ (obtido de quiabeiro

em Lavras-MG) e ‘Vert.94’ (obtido de berinjela em Brazlândia-DF). Foram utilizados os seguintes isolados da raça 2: ‘Vert. 63’ e ‘Vert. 93’ (obtidos de tomateiro em Caçador-SC e Araguari-MG, respectivamente). Todos isolados foram previamente testados quanto à virulência em tomate. As cultivares Ponderosa e Floradade foram utilizadas como controles. A produção de mudas dos acessos e do inóculo seguiram a mesma metodologia descrita previamente. Neste segundo ensaio foram quantificados dois parâmetros epidemiológicos: período de incubação (PI), definido como o período transcorrido (em dias) entre a inoculação e o aparecimento de sintomas (murcha e/ou necrose em “V” nas folhas) e índice de doença (ID), baseado na severidade estimada na última avaliação. O PI foi avaliado diariamente (a partir do 15º dia após a inoculação) quando apareceram os primeiros sintomas em algum dos acessos. A avaliação do PI foi concluída no 30º dia após a inoculação, quando foi feita a última avaliação da severidade. Os acessos que não apresentaram sintomas aparentes tiveram o PI arbitrariamente ajustado para 31 dias (30 dias de avaliação acrescidos de um dia), conforme proposto por Iamsupisit *et al.* (1993). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 5 x 40. Na conclusão do experimento, avaliou-se a severidade final através da escala de notas descrita anteriormente. A partir destes dados foi calculado o índice de doença, em que  $ID (%) = 100S[(f.v)/(n.x)]$ , sendo  $f$  = número de plantas com a mesma nota;  $v$  = nota observada;  $n$  = número total de plantas avaliadas e  $x$  = nota máxima da escala (Dalbosco *et al.*, 2002). Os dados de PI e ID foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de agrupamentos de médias Scott-Knott através do programa de análises estatísticas SisVar versão 4.2 (Ferreira, 2003). Foram determinadas as correlações fenotípicas (correlação de Pearson) entre as variáveis PI e ID para cada isolado de *Verticillium*, com auxílio do Software Genes (Cruz, 2006).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 100 acessos avaliados, 38 (in-

cluindo o padrão de resistência ‘Floradade’) apresentaram resposta classificada como resistente e 62 (incluindo o padrão de suscetibilidade ‘Ponderosa’) foram classificados como suscetíveis para o isolado ‘Vert.94’ (raça 1). No grupo dos acessos classificados como resistentes estavam representadas as seguintes espécies: *S. lycopersicum*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum* e *S. pimpinellifolium*. Destes, destacaram-se dois acessos de *S. habrochaites* (‘CNPH-0417’ e ‘CNPH-0421’) e um acesso de *S. lycopersicum* (‘CNPH-0437’), que apresentaram reação do tipo imunidade (Tabela 1).

Os resultados deste primeiro ensaio confirmam as observações de Santos *et al.* (2004), onde foi identificado um número reduzido de acessos selvagens com resistência ao patógeno, sendo que um número maior de acessos resistentes foi encontrado dentro da espécie cultivada (*S. lycopersicum*). A predominância de acessos resistentes em *S. lycopersicum*, pode ser explicada pela maciça incorporação do gene de resistência *Ve-1* em linhagens comerciais em diferentes programas de melhoramento conduzidos no mundo (Bender & Shoemaker, 1984; Accari *et al.*, 2005). No entanto, novas fontes de resistência à raça 1 foram encontradas em acessos de algumas espécies selvagens, sugerindo uma provável diversidade alélica para o gene *Ve-1* nos diferentes acessos de tomateiro (Tabela 1).

No segundo ensaio, a virulência e identidade da raça fisiológica dos isolados foi confirmada pelas respostas exibidas pelo conjunto de variedades diferenciadas. As cultivares de tomate ‘Ponderosa’, berinjela ‘Ciça’ e jiló ‘Morro Redondo’ apresentaram suscetibilidade a todos os isolados do patógeno. Por sua vez, a cultivar ‘Floradade’ (‘CNPH-0010’) demonstrou resistência a isolados da raça 1 e suscetibilidade a isolados da raça 2. Neste segundo ensaio, 27 dos 38 acessos avaliados com o isolado ‘Vert. 94’ (raça 1) voltaram a expressar níveis de resistência similares, confirmando a reação observada na primeira triagem. Entretanto, os acessos *S. habrochaites* ‘CNPH-0417’ e *S. habrochaites* ‘CNPH-0421’ não confirmaram a imunidade apresentada no primeiro experimento, indicando que

esta “resistência” pode ter se dado por escape ou que é de natureza quantitativa, sendo influenciada por componentes ambientais. Diferenças na capacidade de causar doença foram observadas em um grupo de isolados de *V. dahliae* de uma mesma raça, mas oriundos de regiões geográficas distintas (O’Garro & Clarkson, 1988), sugerindo que diferenças entre isolados também possam explicar a instabilidade da resposta de resistência observada em alguns dos acessos no presente ensaio.

Os resultados das reações dos acessos avaliados em relação aos valores dos parâmetros epidemiológicos PI e ID encontram-se na Tabela 2 (resposta para isolados da raça 1) e na Tabela 3 (resposta para isolados da raça 2). A diferenciação dos acessos de acordo com o critério PI foi significativa (teste de Scott-Knott, 5%). A cultivar ‘Ponderosa’ esteve entre acessos com menor PI, para todos os isolados inoculados, confirmando a sua condição de hospedeira “universal” de isolados de *Verticillium*. O parâmetro ID foi eficiente para diferenciar os acessos em distintas classes de resistência (teste de Scott-Knott, 5%). O grupo de acessos pertencente a cada classe foi variável de acordo com o isolado/raça do patógeno utilizado (Tabelas 2 e 3). Um período de incubação longo é um importante componente de resistência parcial de uma espécie de planta hospedeira a um dado patógeno (Van der Plank, 1963). Para alguns acessos inoculados com *V. dahliae*, observou-se PI maiores, sendo que, algumas vezes, os sintomas se tornaram evidentes somente na avaliação final. Entretanto, foi verificado que alguns acessos considerados extremamente suscetíveis apresentaram uma combinação de PI altos e ID elevados. Isso pode ser atribuído ao fato de que na avaliação do PI se considerou somente os sintomas externos (aparentes) e excluindo a avaliação de sintomas de escurecimento vascular (internos).

Acessos que exibiram resistência a pelo menos um isolado e que apresentaram valores de ID menores quando comparados com acessos suscetíveis foram considerados como resistentes a este isolado. Cerezine (1989) verificou valores de ID menores que 30% para cultivares de tomateiro resistentes a

**Tabela 1.** Acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) classificados como resistentes ao isolado 'Vert. 94' (*Verticillium dahliae* raça 1) na primeira triagem [*Solanum* (section *Lycopersicon*) accessions classified as resistant to 'Vert. 94' (*Verticillium dahliae* race 1) isolate in the first screening assay]. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008.

<b>Código do acesso</b>	<b>Espécie botânica</b>	<b>Cultivar/linhagem/pedigree</b>	<b>Nota*</b>	<b>Reação**</b>
CNPH - 0010 (FD)	<i>S. lycopersicum</i>	Floradade	2,00	R
CNPH - 0878 (PD)	<i>S. lycopersicum</i>	Ponderosa (testemunha suscetível)	3,16	S
CNPH - 0416	<i>S. habrochaites</i>	PI 126445	1,16	R
CNPH - 0417	<i>S. habrochaites</i>	PI 126449	1,00	R
CNPH - 0419	<i>S. pimpinellifolium</i>	PI 126931	2,00	R
CNPH - 0421	<i>S. habrochaites</i>	PI 127827	1,00	R
CNPH - 0424	<i>S. habrochaites</i>	PI 134418	1,25	R
CNPH - 0427	<i>S. lycopersicum</i>	IRAT-L3	1,58	R
CNPH - 0428	<i>S. lycopersicum</i>	72-TR-4-4	1,42	R
CNPH - 0431	<i>S. lycopersicum</i>	Campbell 28	1,08	R
CNPH - 0437	<i>S. lycopersicum</i>	LA 1563	1,00	R
CNPH - 0439	<i>S. lycopersicum</i>	Ohio 7870	1,25	R
CNPH - 0457	<i>S. lycopersicum</i>	Rey de los Tempranos	1,73	R
CNPH - 0525	<i>S. lycopersicum</i>	Silvestre	1,33	R
CNPH - 0538	<i>S. lycopersicum</i>	(XPH5300)F2	1,08	R
CNPH - 0602	<i>S. peruvianum</i>	var. dentatum	1,50	R
CNPH - 0698	<i>S. lycopersicum</i>	Ohio 4013	1,41	R
CNPH - 0717	<i>S. lycopersicum</i>	Calmart	1,25	R
CNPH - 0781	<i>S. peruvianum</i>	CGO 6709	2,00	R
CNPH - 0783	<i>S. peruvianum</i>	CGO 6707	1,58	R
CNPH - 0784	<i>S. peruvianum</i>	CGO 6711	2,00	R
CNPH - 0785	<i>S. peruvianum</i>	CGO 6712	1,75	R
CNPH - 0797	<i>S. peruvianum</i>	LA 1609	1,67	R
CNPH - 0798	<i>S. peruvianum</i>	LA 1616	2,00	R
CNPH - 1034	<i>S. habrochaites</i>	Desconhecido	2,00	R
CNPH - 1035	<i>S. peruvianum</i>	Desconhecido	1,09	R
CNPH - 1038	<i>S. pimpinellifolium</i>	Luteum	1,67	R
CNPH - 1039	<i>S. pimpinellifolium</i>	Desconhecido	2,00	R
CNPH - 1046	<i>S. lycopersicum</i>	Hawaii 7998	1,18	R
CNPH - 1048	<i>S. lycopersicum</i>	Hawaii 7996	1,83	R
CNPH - 1112	<i>S. habrochaites</i>	Selvagem	1,25	R
CNPH - 1120	<i>S. lycopersicum</i>	Philipino 2	2,00	R
CNPH - 1122	<i>S. habrochaites</i>	L. 03684	2,00	R
CNPH - 1123	<i>S. pimpinellifolium</i>	L. 03707	1,27	R
CNPH - 1249	<i>S. peruvianum</i>	LA 372	2,00	R
CNPH - 1260	<i>S. lycopersicum</i>	PI 126428	1,08	R
CNPH - 1439	<i>S. peruvianum</i>	LA 0454	2,00	R
CNPH - 1440	<i>S. peruvianum</i>	LA 1274	1,08	R
CNPH - 1498	<i>S. peruvianum</i>	PI 114490	1,17	R

\*Escala 1 até 5 onde 1= plantas sem sintomas; 2= plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com leve escurecimento vascular; 3= plantas com escurecimento vascular intenso e/ou com murcha ou amarelecimento foliar; 4= plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento, necrose foliar e seca de ramos e 5= plantas mortas; \*\*R= resistente; S= suscetível. Os acessos que apresentaram notas médias entre 1 e 2 foram considerados resistentes e aqueles com notas acima de "2" foram considerados suscetíveis (\*Scale from 1 to 5: 1 = plants presenting no symptom; 2 = plants without wilt or yellowing symptoms, but presenting slight vascular darkening; 3 = plants with intense vascular darkening and/or wilt or leaf yellowing; 4 = plants with intense wilt associated to leaf yellowing, leaf necrosis and drought of branches and 5 = dead plants).

**Tabela 2.** Reação de acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) selecionados na primeira triagem contra três isolados de *Verticillium dahliae* pertencentes à raça 1. Foram avaliados dois parâmetros epidemiológicos: período de incubação (PI) e índice de doença (ID), baseado na severidade estimada na última avaliação [reaction against three *Verticillium dahliae* race 1 isolates of *Solanum* (section *Lycopersicon*) accessions previously selected for resistance to one race 1 isolate. Two epidemiological parameters were evaluated: incubation period (PI) and disease index (ID), which were based upon the levels of disease severity in the last evaluation]. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008.

Código do acesso	‘Vert. 02’		‘Vert. 12’		‘Vert. 94’	
	PI	ID	PI	ID	PI	ID
CNPH - 0010 (FD)	30,0 c	25,0 b	30,9 c	6,2 a	30,0 b	25,0 b
CNPH - 0878 (PD)	22,3 b	46,0 d	21,0 a	36,1 b	25,0 a	50,0 d
CNPH - 0416	30,0 c	14,6 a	30,3 c	33,3 b	30,0 b	25,0 b
CNPH - 0417	28,0 c	54,2 d	29,7 c	37,7 c	30,0 b	25,0 b
CNPH - 0419	24,6 b	56,2 d	29,3 c	37,6 c	30,0 b	36,3 c
CNPH - 0421	30,0 c	4,2 a	21,0 a	50,0 c	29,8 b	37,7 c
CNPH - 0424	28,7 c	47,9 d	28,6 c	50,0 c	29,8 b	31,3 b
CNPH - 0427	30,0 c	35,5 c	30,7 c	22,3 b	30,0 b	25,0 b
CNPH - 0428	30,9 c	5,5 a	30,6 c	18,6 a	30,5 b	16,6 b
CNPH - 0431	30,6 c	16,7 b	31,0 c	0,0 a	30,9 b	4,3 a
CNPH - 0437	30,3 c	24,3 b	30,7 c	10,6 a	30,8 b	8,3 a
CNPH - 0439	30,7 c	6,2 a	30,3 c	4,3 a	30,2 b	23,0 b
CNPH - 0457	26,3 b	38,9 c	27,6 c	35,3 b	30,0 b	50,0 d
CNPH - 0525	30,0 c	45,8 d	29,7 c	23,0 b	29,7 b	32,7 c
CNPH - 0538	29,3 c	25,0 b	30,6 c	18,3 a	30,0 b	25,0 b
CNPH - 0602	20,7 a	56,2 d	24,6 b	42,0 c	30,0 b	50,0 d
CNPH - 0698	30,7 c	18,1 b	30,0 c	25,0 b	30,0 b	25,0 b
CNPH - 0717	30,0 c	14,6 a	31,0 c	0,0 a	30,5 b	12,0 a
CNPH - 0781	26,0 b	37,4 c	28,0 c	29,3 b	29,9 b	30,3 b
CNPH - 0783	29,0 c	47,2 d	30,3 c	33,3 b	29,7 b	30,3 b
CNPH - 0784	25,0 b	47,2 d	30,7 c	10,0 a	30,0 b	25,0 b
CNPH - 0785	20,7 a	58,3 d	30,0 c	25,0 b	30,0 b	41,7 c
CNPH - 0797	30,0 c	52,7 d	22,6 a	46,0 c	30,0 b	25,0 b
CNPH - 0798	25,0 b	50,3 d	27,6 c	27,6 b	30,0 b	31,0 b
CNPH - 1034	30,7 c	27,7 b	30,7 c	16,6 a	30,0 b	50,0 d
CNPH - 1035	30,0 c	29,2 b	29,0 c	52,3 c	30,0 b	50,0 d
CNPH - 1038	27,0 c	30,3 b	29,3 c	17,0 a	30,9 b	6,0 a
CNPH - 1039	30,0 c	20,8 b	25,0 b	2,0 a	29,9 b	30,3 b
CNPH - 1046	30,0 c	22,2 b	30,9 c	2,0 a	30,0 b	25,0 b
CNPH - 1048	25,0 b	39,9 c	21,6 a	45,0 c	29,7 b	35,0 c
CNPH - 1112	27,0 c	33,2 c	29,0 c	27,0 b	30,0 b	25,0 b
CNPH - 1120	30,0 c	25,0 b	30,8 c	10,3 a	30,9 b	2,0 a
CNPH - 1122	31,0 c	0,0 a	31,0 c	0,0 a	29,9 b	25,3 b
CNPH - 1123	28,0 c	37,8 c	30,6 c	12,6 a	30,0 b	48,0 d
CNPH - 1249	29,6 c	22,9 b	30,0 c	25,0 b	30,0 b	50,0 d
CNPH - 1260	30,0 c	33,3 c	30,0 c	25,0 b	30,9 b	5,7 a
CNPH - 1277	23,3 b	56,3 d	29,7 c	29,3 b	29,7 b	37,6 c
CNPH - 1439	30,5 c	12,0 a	30,5 c	16,7 a	29,7 b	35,0 c
CNPH - 1440	30,0 c	33,1 c	30,6 c	27,6 b	30,0 b	25,0 b
CNPH - 1498	24,6 b	38,9 c	30,6 c	27,0 b	31,9 b	2,6 a
CV (%)	6,88	23,73	7,57	49,91	1,24	31,24
Correlação de Pearson	-0,7218		-0,5709		-0,5626	

ambas as raças do patógeno ('Ohio 12' e 'Petomech VF 1+2'). Alguns acessos, tais como 'CNPH-0698 e 'CNPH-1120', apresentaram uma resistência (valores de PI iguais ou próximos de 31 dias e ID abaixo dos 25%) a diferentes isolados das duas raças, sendo, portanto, de maior amplitude. De acordo com Van der Plank (1963), a resistência vertical, raça-específica ou imunidade pode ser facilmente quebrada devido à variabilidade do patógeno. Foi constatada correlação significativas entre o PI e o ID, a qual variou de 54% a 86% e foi negativa, conforme esperado. A correlação significativa e negativa observada entre PI e ID para todos os isolados testados mostra que, no geral, quanto maior os valores de PI menores serão os valores do ID. Levando em consideração o que foi discutido acima sobre o PI e os resultados do teste de correlação, neste trabalho o parâmetro mais seguro para selecionar os acessos quanto à resistência à murcha-de-verticillio foi o ID. Este parâmetro pode ser utilizado individualmente ou em conjunto com outros parâmetros epidemiológicos (não avaliados no presente trabalho) nos testes de identificação de acessos de tomate com resistência a *V. dahliae*.

A quebra de resistência de acessos de tomateiro por isolados de *V. dahliae* raça 2 pode ser explicada pela utilização maciça de cultivares portadoras do gene *Ve*, que confere resistência a isolados da raça 1 (Cerezine *et al.*, 1991). Este uso maciço representou uma pressão de seleção para isolados virulentos às cultivares portadoras do gene *Ve-1*. A resistência do gene *Ve-1* apresenta grande estabilidade, pois acessos de tomateiros que possuem este gene (tais como 'Floradade' e 'Marmande VR') sempre apresentam resistência vertical quando inoculados com isolados da raça 1 (Laterrot *et al.*, 1983; Reis *et al.*, 2007).

Reação de suscetibilidade para todos os isolados (das duas raças) foi observada na cultivar 'Ponderosa' e 'Floradade' apresentou suscetibilidade para os isolados da raça 2, confirmando a identidade de raça dos isolados e

**Tabela 3.** Reação de acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) selecionados na primeira triagem contra dois isolados de *Verticillium dahliae* pertencentes à raça 2. Foram avaliados dois parâmetros epidemiológicos: período de incubação (PI) e índice de doença (ID), baseado na severidade estimada na última avaliação [reaction against two *Verticillium dahliae* race 2 isolates of *Solanum* (section *Lycopersicon*) accessions previously selected for resistance to one race 1 isolate. Two epidemiological parameters were evaluated: incubation period (PI) and disease index (ID), which were based upon the levels of disease severity in the last evaluation]. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2008.

Código do acesso	'Vert. 63'		'Vert. 93'	
	PI	ID	PI	ID
CNPH - 0010 (FD)	23,3 b	44,7 b	22,0 b	44,3 b
CNPH - 0878 (PD)	22,7 b	48,0 b	22,0 b	41,3 b
CNPH - 0416	29,3 c	44,3 b	24,3 c	50,7 b
CNPH - 0417	18,3 a	48,0 b	18,3 a	52,3 b
CNPH - 0419	26,3 c	33,7 a	19,7 a	41,7 b
CNPH - 0421	30,6 c	15,3 a	30,7 e	12,7 a
CNPH - 0424	30,2 c	21,0 a	29,9 e	29,0 a
CNPH - 0427	30,0 c	25,0 a	26,3 d	35,7 b
CNPH - 0428	30,9 c	2,7 a	30,7 e	21,0 a
CNPH - 0431	26,7 c	38,3 b	30,5 e	12,7 a
CNPH - 0437	30,6 c	19,3 a	30,9 e	8,3 a
CNPH - 0439	24,3 b	41,7 b	29,9 e	27,0 a
CNPH - 0457	27,0 c	33,7 a	29,7 e	35,3 b
CNPH - 0525	30,4 c	21,0 a	29,9 e	31,3 a
CNPH - 0538	30,3 c	25,0 a	30,7 e	21,0 a
CNPH - 0602	24,0 b	29,0 a	23,7 c	44,0 b
CNPH - 0698	30,3 c	19,3 a	30,8 e	19,3 a
CNPH - 0717	30,0 c	25,0 a	30,8 e	18,7 a
CNPH - 0781	21,7 b	41,6 b	27,0 d	58,3 b
CNPH - 0783	18,3 a	41,6 b	25,3 c	43,3 b
CNPH - 0784	23,6 b	33,0 a	24,3 c	46,0 b
CNPH - 0785	22,7 b	42,0 b	22,0 b	50,0 b
CNPH - 0797	22,7 b	37,7 b	24,0 c	44,7 b
CNPH - 0798	22,7 b	44,3 b	23,7 c	41,7 b
CNPH - 1034	30,4 c	17,0 a	30,6 e	19,0 a
CNPH - 1035	30,6 c	21,0 a	30,0 e	25,0 a
CNPH - 1038	22,0 b	41,6 b	23,7 c	41,7 b
CNPH - 1039	29,9 c	27,3 a	26,3 d	23,0 a
CNPH - 1046	29,9 c	27,3 a	29,9 e	26,3 a
CNPH - 1048	22,0 b	44,0 b	28,0 d	29,0 a
CNPH - 1112	17,0 a	50,0 b	20,3 a	50,0 b
CNPH - 1120	30,2 c	22,3 a	30,8 e	12,7 a
CNPH - 1122	23,3 b	50,0 b	29,6 e	37,7 b
CNPH - 1123	17,0 a	58,0 b	27,3 d	38,0 b
CNPH - 1249	24,3 b	41,7 b	28,3 d	50,0 b
CNPH - 1260	28,3 c	41,6 b	30,2 e	20,7 a
CNPH - 1277	20,7 b	48,0 b	27,7 d	35,3 b
CNPH - 1439	29,9 c	27,7 a	26,0 d	27,7 a
CNPH - 1440	25,3 b	42,0 b	24,0 c	50,0 b
CNPH - 1498	18,7 a	44,3 b	21,3 b	50,0 b
CV (%)	11,27	30,73	6,95	26,34
Correlação de Pearson	-0,8398		-0,7866	

concordando com resultados obtidos anteriormente (Santos, 1997; Reis & Boiteux, 2006b; Reis *et al.*, 2007). Os isolados ‘Vert.94’, e ‘Vert.12’, provenientes de berinjela e de quiabo, respectivamente, foram virulentos em diversos acessos de tomateiro. Isto reforça a natureza polífaga de *V. dahliae* (Reis & Boiteux, 2006b). Apesar disso, existem trabalhos que separam isolados do fungo de acordo com o hospedeiro e através da reação de diferentes espécies em testes de inoculação cruzada (Bhat & Subbarao, 1999).

Foram identificados acessos pertencentes a *S. lycopersicum* e *S. habrochaites* resistentes a pelo menos um isolado da raça 1, com destaque para ‘CNPH-1046’, ‘CNPH-1039’ e ‘CNPH-1122’. Acessos resistentes a pelo menos um isolado da raça 2 foram identificados nas espécies *S. lycopersicum* e *S. habrochaites* com destaque para os acessos ‘CNPH-0424’, ‘CNPH-0427’ e ‘CNPH-0431’. De acordo com a literatura, este parece ser o primeiro registro de resistência a isolados de *V. dahliae* em *S. habrochaites*. O acesso ‘Campbell-28’ (‘CNPH-0431’) apresentou alta resistência no primeiro e no segundo ensaio para o isolado ‘Vert.94’ (raça 1). Além disso, este acesso mostrou resposta resistente aos isolados ‘Vert.02’ e ‘Vert.12’ (ambos classificados como raça 1) e ao isolado ‘Vert.93’ (raça 2). É interessante ressaltar que o acesso ‘Campbell-28’ foi identificado como uma fonte de resistência a alguns isolados da raça 2 nos Estados Unidos (Okie & Gardner, 1982). Entretanto, ‘Campbell-28’ não possui, aparentemente, resistência de amplo espectro, uma vez que este acesso se mostrou suscetível ao isolado ‘Vert.63’ (classificado como raça 2). Foram identificados outros acessos dentro da espécie cultivada *S. lycopersicum* com resistência parcial a todos os isolados inoculados com destaque para ‘CNPH-0698’, ‘CNPH-0428’ e ‘CNPH-1120’.

Alguns acessos (por exemplo ‘CNPH-0698’ e ‘CNPH-1120’) apresentaram resistência do tipo “horizontal” (*sensu* Van der Plank, 1963) ou “parcial” e outros acessos apresentaram resistência do tipo “vertical” ou mais precisamente “raça 1-específica”. Com a existência de duas raças fisiológicas

do patógeno confirmadas, é de grande importância o desenvolvimento de cultivares que possuam um espectro de resistência mais amplo (resistência horizontal), combinada com a presença de genes maiores para resistência às duas raças. Os acessos que demonstraram melhor desempenho foram classificados dentro da espécie cultivada de tomateiro (*S. lycopersicum*), incluindo um grupo que apresentou resistência do tipo “horizontal” a todos os isolados inoculados. A grande vantagem da identificação de resistência em cultivares comerciais deve-se ao fato de que estas já apresentam diversas características de interesse e poucas características indesejáveis (muito comuns em acessos de espécies selvagens), que necessitam ser eliminadas através de longos processos de seleção dentro dos programas de melhoramento genético.

A reação do acesso ‘Campbell-28’ (‘CNPH-0431’) aos diversos isolados avaliados foi inesperada, considerando a existência de apenas duas raças do patógeno. Novos estudos, com este e alguns outros acessos da hospedeira são necessários, uma vez que ‘Campbell-28’ (‘CNPH-0431’) pode, potencialmente, representar uma nova hospedeira diferencial e revelar a existência de uma terceira raça fisiológica de *V. dahliae*. A inoculação de diversos acessos (resistentes a uma ou às duas raças) com isolados das duas raças, de diferentes hospedeiras e locais de procedência, pode ajudar a esclarecer a existência ou não de novas raças de *V. dahliae*. De fato, Baergen *et al.* (1993) já haviam verificado que acessos de tomateiro norte-americanos classificados como resistentes à raça 2 do patógeno foram suscetíveis a isolados brasileiros da mesma raça do patógeno. No entanto, é preciso considerar, também, que estes resultados podem ser creditados a outros aspectos, tais como agressividade diferencial dos isolados (O’Garro & Clarkson, 1988), condições ambientais e até mesmo erro experimental.

A resistência para a raça 2 de *V. dahliae* observada em acessos de tomateiro neste trabalho assemelha-se ao tipo quantitativa ou “horizontal” (*sensu* Van der Plank, 1963). Isto pode dificultar um pouco mais os programas de melhora-

mento, que visem à incorporação/piramidização da resistência às duas raças de *V. dahliae* em cultivares comerciais de tomate. A incorporação de resistência do tipo “horizontal” é mais trabalhosa, demorada e de fenotipação mais complexa. Por outro lado, a incorporação desta resistência em cultivares comerciais, bem como sua complementação/piramidização com genes de maior espectro de resistência, pode também contribuir para uma maior durabilidade da mesma (Van der Plank, 1963).

Em conclusão, os resultados sugerem que as novas fontes de resistência descritas podem ser úteis para futuros programas de melhoramento genético do tomateiro visando resistência às duas raças de *V. dahliae*. Entretanto, ainda é necessária a combinação da resistência genética com outras medidas de controle da doença. É também fundamental o estabelecimento de um sistema de monitoramento constante da variabilidade do patógeno (incluindo o potencial surgimento de novas raças). Além disso, existe a necessidade de novas avaliações, com um número maior de isolados de ambas as raças visando identificar os acessos mais adequados para programas de melhoramento genético bem como o desenvolvimento de cultivares com resistência mais estável e durável.

## AGRADECIMENTOS

Os autores Leonardo S Boiteux e Ailton Reis agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ACCIARRI N; ROTINO GL; TAMIETTI G; VALENTINO D; VOLTATTORNI S; SABATINI E. 2005. Molecular markers for *Ve1* and *Ve2* *Verticillium* resistance genes from Italian tomato germplasm. *Plant Breeding* 126: 617-621.
- BAERGEN KD; HEWITT JD; ST-CLAIR DA. 1993. Resistance of tomato genotypes to four isolates of *Verticillium dahliae* race 2. *HortScience* 28: 833-836.
- BENDER CG; SHOEMAKER PB. 1984. Prevalence of *Verticillium* wilt of tomato and virulence of *Verticillium dahliae* race 1 and race 2 isolates in Western North Carolina. *Plant Disease* 68: 305-309.
- BHAT RG; SUBBARAO KV. 1999. Host

- range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89: 1218-1225.
- CEREZINE PC. 1989. *Murcha de Verticillium em tomateiro: variabilidade do patógeno e comportamento de variedades*. Botucatu: UNESP. 80p. (tese mestrado).
- CEREZINE PC; KUROZAWA C; MISCHAN MM. 1990. Variabilidade patogênica de *Verticillium albo-atrum* em tomateiro. *Summa Phytopathologica* 16: 28.
- CEREZINE PC; KUROZAWA C; MISCHAN MM. 1991. Murcha de *Verticillium* em tomateiro: 1. Influência do potencial de inóculo de *Verticillium dahliae* no comportamento de variedades de tomateiro Ângela Hiper e Marmade VR. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26: 2043-2054.
- CRUZ CD. 2006. Programa GENES Estatística Experimental e Matrizes. Viçosa: Editora UFV. 285p.
- DALBOSCO M; SCHONS J; PRESTES AM. 2002. Incidência e índice de doença do mosaico do trigo em cereais de inverno e em gramíneas de verão, associados ao *Polymyxa graminis*. *Fitopatologia Brasileira* 27: 48-52.
- DIWAN N; FLUHR R; ESHED Y; ZAMIR D; TANKSLEY SD. 1999. Mapping of *Ve* in tomato: a gene conferring resistance to the broad-spectrum pathogen, *Verticillium dahliae* race 1. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 315-319.
- FERREIRA DR. Sisvar versão 4.2. DEX/UFLA. 2003.
- FRADIN EF; ZHANG Z; JUAREZ AYALA JC; CASTROVERDE CDM; NAZAR RN; ROBB J; LIU CM; THOMMA BPHJ. 2009. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato *Ve1*. *Plant Physiology* 150: 320-332.
- IAMSUPASIT N; CHAKRABORTY S; CAMERON DF; ADKINS SW. 1993. Components of quantitative resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in tetraploid accessions of the pasture legume *Stylosanthes hamata*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 33: 855-860.
- KAWCHUK LM; HACHEY J; LYNCH DR; KULCSAR F; VAN ROOIJEN G; WATERER DR; ROBERTSON A; KOKKO E; BYERS R; HOWARD RJ; FISCHER R; PRÜFER D. 2001. Tomato *Ve* disease resistance gene encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 6511-6515.
- LATERROT H; MELO PCT; BLANCARD D. 1983. Ocorrência da raça 2 de *Verticillium* em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Horticultura Brasileira* 1: 22-25.
- O'GARRO LW; CLARKSON JM. 1988. Pathogenicity of race-1 and race-2 tomato wilt isolates of *Verticillium dahliae* from different geographical origins. *Journal of Phytopathology* 123: 297-303.
- OKIE WR; GARDNER RG. 1982. Screening tomato seedlings for resistance to *Verticillium dahliae* races 1 and 2. *Plant Disease* 66: 34-37.
- REIS A; BOITEUX LS. 2006a. *Murcha-de-verticillium: um sério problema para o cultivo de hortaliças no Brasil*. Brasília: Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 40. 11p.
- REIS A; BOITEUX LS. 2006b. *Círculo de hospedeiras de isolados de Verticillium dahliae obtidos de tomateiro, quiabeiro e morangueiro*. Brasília: Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 21. 16p.
- REIS A; BOITEUX LS; COSTA H. 2007. *Determinação de espécies e de raças de isolados de Verticillium oriundos de diferentes Estados do Brasil*. Brasília: Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 31. 13p.
- SANTOS JRM. 1997. Methodology for screening tomato for Fusarium Wilt, Verticillium Wilt, Gray Leaf Spot, Early Blight and Septoria Leaf Blight. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PROCESSING TOMATO, 1<sup>st</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL TOMATO DISEASES, 1996, Recife-PE. Proceedings. Alexandria: ASHS: IPA. p. 164-166.
- SANTOS JRM; LOPES CA. 1995. Ocorrência de *Verticillium dahliae* raça 2 em tomateiro no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 20: 355.
- SANTOS JRM; REIS A; BOITEUX LS; GIORDANO LB. 2004. Fontes de resistência genética múltipla a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 e *Verticillium dahliae* raça 2 em germoplasma de *Lycopersicon*. *Summa Phytopathologica* 30: 110-111.
- SCHAIBLE L; CANNON OS; WADDOUPS V. 1951. Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in a tomato cross. *Phytopathology* 41: 986-990.
- STAMOVA L. 2005. Resistance to *Verticillium dahliae* race 2 and its introgression into processing tomato cultivars. *Acta Horticulturae* 695: 257-262.
- VAN DER PLANK JE. 1963. *Plant diseases: epidemics and control*. New York: Academic. 349p.