



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0710887-7 A2**

(22) Data de Depósito: 25/04/2007  
(43) Data da Publicação: 17/07/2012  
(RPI 2167)



(51) *Int.Cl.:*  
C12N 15/82  
A01H 5/08

**(54) Título:** MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA DE TOMATE RESISTENTE A BOTRYTIS, PLANTA DE TOMATE RESISTENTE A BOTRYTIS OU PARTE DA MESMA, LOCAL DE CARACTERÍSTICA QUANTITATIVA PARA RESISTÊNCIA A BOTRYTIS EM S. LYCOPERSICUM, AMOSTRA DE DNA ISOLADO, MÉTODO PARA DETECTAR UM LOCAL DE CARACTERÍSTICA QUANTITATIVA PARA RESISTÊNCIA A BOTRYTIS, PLANTA RESISTENTE A BOTRYTIS, PLANTA RESISTENTE A BOTRYTIS DA ESPÉCIE S. LYCOPERSICUM OU PARTE DA MESMA, PLANTA DE TOMATE HÍBRIDA OU PARTES DA MESMA CULTURA DE TECIDO, E, USO DE UM MARCADOR GENÉTICO

**(30) Prioridade Unionista:** 25/04/2006 EP 06075950.3

**(73) Titular(es):** De Ruiters Seeds R&D B.V.

**(72) Inventor(es):** Adriaan Willem Van Heusden, Hendrikus Johannes Finkers, Paulus Cornelis Maris, Willem Hendrik Lindhout

**(74) Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

**(86) Pedido Internacional:** PCT NL2007050183 de 25/04/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2007/123407 de 01/11/2007

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA DE TOMATE RESISTENTE A BOTRYTIS, PLANTA DE TOMATE RESISTENTE A BOTRYTIS OU PARTE DA MESMA, LOCAL DE CARACTERÍSTICA QUANTITATIVA PARA RESISTÊNCIA A BOTRYTIS EM S. LYCOPERSICUM, AMOSTRA DE DNA ISOLADO, MÉTODO PARA DETECTAR UM LOCAL DE CARACTERÍSTICA QUANTITATIVA PARA RESISTÊNCIA A BOTRYTIS, PLANTA RESISTENTE A BOTRYTIS DA ESPÉCIE S. LYCOPERSICUM OU PARTE DA MESMA, PLANTA DE TOMATE HÍBRIDA OU PARTES DA MESMA, CULTURA DE TECIDO, E, USO DE UM MARCADOR GENÉTICO. A presente invenção se refere a um método para detectar um local de característica quantitativa (QTL) associado com resistência a Botrytis cinerea em tomate, compreendendo as etapas de cruzar uma planta de tomate doadora resistente a Botrytis com uma planta de tomate receptora não resistente ou susceptível a Botrytis, colocando em contato uma ou mais plantas descendentes com uma quantidade não eficaz de Botrytis, determinando quantitativamente a incidência de doença e/ou a taxa de crescimento de lesão em dita uma ou mais plantas descendentes, estabelecendo um mapa de ligação genética que liga a incidência de doença e/ou taxa de crescimento de lesão com a presença de marcadores cromossômicos de dita planta de tomate doadora em dita uma ou mais plantas descendentes, e determinando para um QTL os marcadores contíguos em dito mapa que estão ligados a uma incidência de doença reduzida e/ou uma taxa de crescimento de lesão reduzida.

“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA DE TOMATE  
RESISTENTE A BOTRYTIS, PLANTA DE TOMATE RESISTENTE A  
BOTRYTIS OU PARTE DA MESMA, LOCAL DE CARACTERÍSTICA  
QUANTITATIVA PARA RESISTÊNCIA A BOTRYTIS EM S.  
5 LYCOPERSICUM, AMOSTRA DE DNA ISOLADO, MÉTODO PARA  
DETECTAR UM LOCAL DE CARACTERÍSTICA QUANTITATIVA  
PARA RESISTÊNCIA A BOTRYTIS, PLANTA RESISTENTE A  
BOTRYTIS DA ESPÉCIE S. LYCOPERSICUM OU PARTE DA MESMA,  
PLANTA DE TOMATE HÍBRIDA OU PARTES DA MESMA, CULTURA  
10 DE TECIDO, E, USO DE UM MARCADOR GENÉTICO”

#### CAMPO TÉCNICO

A presente invenção se refere a melhoramento vegetal e  
biologia molecular. Mais especificamente, a presente invenção se refere a um  
método para detectar um locus de característica quantitativa (QTL) associado  
15 com resistência a *Botrytis cinerea* em tomate, a um método de produzir uma  
planta de tomate resistente a *Botrytis* com isto e a plantas de tomate  
resistentes a *Botrytis* assim obtidas e partes das mesmas.

#### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

*Botrytis cinerea* é um fungo patogênico necrotrófico com uma  
20 variedade de hospedeiros excepcionalmente ampla compreendendo pelo  
menos 235 hospedeiros possíveis. Por causa desta ampla variedade de  
hospedeiros e pelo fato dela afetar partes economicamente importantes da  
planta *B. cinerea* é um grande problema em muitas culturas cultivadas  
comercialmente. Entre cultivadores, o fungo é comumente referido como  
25 *Botrytis*. O tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*; anteriormente  
*Lycopersicon esculentum*) também é susceptível a infecção por *Botrytis* e o  
fungo geralmente afeta caule, folhas e fruto da planta de tomate. Em casas de  
vegetação aquecidas a ocorrência de infecções por *Botrytis* em caules é  
particularmente comum.

*Botrytis* mata ativamente células infectadas, causando podridão mole, queimadura, mancha foliar, tombamento de mudas e cânceres de caule. Folhas afetadas se tornam cobertas com conidióforos e conídios, e subseqüentemente colapsam e murcham. O fungo irá crescer de folhas doentes para o caule e produz lesões marrom-claras secas de uns poucos milímetros a diversos centímetros de comprimento. Lesões também pode se formar em cicatrizes de desrama no caule. As lesões de caule também podem ser cobertas com um mofo-cinzento. Em diversos casos, a infecção cerca o caule e mata a planta. Tecido antigo senescente de uma planta de tomate normalmente é mais susceptível a ataque por *Botrytis* do que tecido mais novo.

A fim de prevenir o desenvolvimento de *Botrytis* em casa de vegetação, a temperatura e umidade relativa podem ser rigorosamente reguladas. Adicionalmente é importante fornecer água sem molhar as folhas. Para plantas desenvolvidas no campo, boa drenagem e controle de ervas daninhas devem ser empregados. Além disso, os níveis de nutrientes das plantas devem ser mantidos altos. Entretanto, estas medidas preventivas não podem evitar completamente a ocorrência de perda produtiva considerável em caso de infecção.

Fungicidas são disponíveis para controlar *Botrytis* tanto em tomates cultivados em casa de vegetação como no campo. Exemplos de alguns fungicidas incluem Dovicide A® e clorotalonil, que também podem ser aplicados aos frutos de tomate depois de colheita. Entretanto, *Botrytis* é conhecido por ter desenvolvido resistência contra diversos fungicidas comumente usados. Em adição, o uso de fungicidas é indesejado tanto de uma perspectiva econômica como de uma ambiental. Atualmente, existe uma necessidade de variedades comerciais de tomate que exibem resistência a *Botrytis*.

Resistência parcial a *Botrytis* foi encontrada em diversas

espécies selvagens de tomate (Egashira et al. 2000; Nicot et al. 2002; Urbasch 1986). Estas plantas entretanto não produzem tomates de culturas comerciais.

Patente Internacional O21085105 descreve uma região genética em cromossoma 10 do genoma de *S. habrochaites* que, acredita-se, esteja envolvida em resistência parcial a *Botrytis*. A introgressão deste material genético em variedades cultivadas de tomate mostrou sustentar plantas de tomate cultivadas que são parcialmente resistentes a *Botrytis*.

Até agora, entretanto, programas de melhoramento que objetivaram fornecer resistência a *Botrytis* em tomate tiveram sucesso limitado. A razão para estes fracos resultados não está clara atualmente. Para uma parte, isto pode ser devido a conhecimento insuficiente na base genética e herança de resistência a *Botrytis*. Para outra parte, isto pode ser devido à ausência de bioensaios apropriados para verificar níveis de resistência a *Botrytis* em plantas de tomate obtidas em programas de melhoramento. A ausência de conhecimento e métodos também complica a seleção de plantas tanto entre acessos selvagens como plantas descendentes que compreendem genes envolvidos em resistência a *Botrytis*.

Em um estudo prévio, os presentes requerentes encontraram que resistência a *Botrytis* em tomate é herdada poligenicamente, e que isto pode explicar parcialmente os fracos resultados em melhoramento para plantas resistentes.

Um objetivo da presente invenção é melhorar o sucesso de programas de melhoramento voltado para fornecer variedades comerciais de tomate que são resistentes a *Botrytis*. Um objetivo adicional da presente invenção é sustentar resistência adicional e/ou melhorada a *Botrytis* em variedades comerciais de tomate. Ainda outro objetivo da presente invenção é sustentar material genético adicional no genoma de acessos de tomate selvagem que está envolvido em resistência a *Botrytis* em tais plantas. Tal material genético adicional pode ser usado para ampliar a base para a

produção de variedades resistentes a *Botrytis* de tomate cultivado.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes requerentes encontraram agora que no genoma de *S. habrochaites* material genético está presente em diversos cromossomas que não haviam sido previamente identificados como envolvidos em resistência a *Botrytis*. De fato, os presentes requerentes identificaram com sucesso loci de características quantitativas (QTLs) no genoma de uma linhagem de um parente selvagem de tomate, i.e. em *Solanum habrochaites* LYC 4/78. Estes QTLs adicionais foram descobertos pelo uso de linhagens de introgressão.

Os requerentes foram subseqüentemente capazes de produzir plantas de tomate resistentes a *Botrytis* cruzando plantas das mesmas linhagens de tomate selvagens (doadoras) resistentes a *Botrytis* com plantas de tomate receptoras não resistentes. Estas plantas exibiram um nível superior de resistência do que qualquer planta de tomate cultivada produzida até agora.

A melhora sobre a arte anterior reside na disponibilidade de critérios de monitoramento adicionais pelos quais o processo de melhoramento pode ser monitorado e dirigido. As plantas descendentes produzidas a partir de um cruzamento entre uma *Solanum habrochaites* selvagem resistente e um tomate cultivado susceptível podem ser selecionadas para ter uma ou mais, ou mesmo todas as regiões genômicas envolvidas na resistência a *Botrytis* no acesso selvagem. Como um resultado, um método de produzir uma planta de tomate é fornecido com o qual a constituição genética requerida pode ser melhor controlada. Uma vantagem do presente método é que, em um sentido genético, a progênie pode ser feita para parecer com o acesso selvagem mais intimamente para a característica desejada. Conseqüentemente, a característica de resistência na planta de tomate cultivada pode ser mais estavelmente introduzida nesta, i.e. as possibilidades são agora fornecidas para verificar quais das regiões genômicas podem ser facilmente introgridas e quais são difíceis de transferir para plantas

descendentes, quais das regiões genômicas são essenciais, quais são co-operativas, e quais podem ser usadas para melhorar adicionalmente níveis de resistência em linhagens parcialmente resistentes de tomate cultivado.

Verificando o nível de resistência a *Botrytis* em várias  
5 linhagens de introgressão, cada uma tendo uma introgressão genômica específica de *S. habrochaites* LYC 4/78, em relação à presença de marcadores moleculares da planta doadora, os presentes requerentes foram capazes de identificar QTLs adicionais ligados a resistência a *Botrytis* nas linhagens de tomate selvagens resistentes e com isso estabelecer a localização de múltiplas  
10 seqüências de DNA conferindo resistência no genoma. Na descrição abaixo, um locus de característica quantitativa (QTL) associado com resistência a *Botrytis* em tomate será discursado em resumo como um QTL para resistência a *Botrytis* ou um QTL associado com resistência a *Botrytis*.

Um total de 5 novos QTLs para resistência a *Botrytis* foram  
15 encontrados em uma linhagem selvagem de tomate de *S. habrochaites*. Um QTL foi localizado em cromossoma 4, que havia sido previamente identificado como tendo um QTL associado com resistência a *Botrytis*. Ainda foi encontrado que uma área neste cromossoma previamente associada com a resistência continha de fato dois QTLs separados. Os outros QTLs foram  
20 identificados em cromossomas 6, 9, 11 e 12. Os novos QTLs podem ser todos ligados a um parâmetro quantitativo que refletiu a capacidade da planta de reduzir o estabelecimento inicial de uma infecção, daqui por diante referido como o parâmetro para incidência de doença (DI), assim como a um parâmetro quantitativo que refletiu a capacidade da planta de tornar mais lenta  
25 a progressão de infecção, daqui por diante referido como o parâmetro para taxa de crescimento de lesão (LG). De novo a presença de um QTL em cromossoma 10, como relatado na arte anterior, não pode ser confirmada pelos métodos usados. Todos os QTLs testados até agora podem ser confirmados verificando resistência a doença em progênies BC5Si ou BCsSz

(retrocruzamento 5, autopolinizado uma ou duas vezes) segregando para os QTLs sob investigação.

A presente invenção se refere em um primeiro aspecto a um método de produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, dito método compreendendo as etapas de

a) fornecer uma planta de tomate doadora resistente a *Botrytis*, preferivelmente uma planta resistente a *Botrytis* da espécie *S. habrochaites*, mais preferivelmente uma planta resistente a *Botrytis* da linhagem *S. habrochaites* LYC 4/78;

b) transferir ácido nucleico de dita planta doadora para uma ou mais plantas de tomate receptoras susceptíveis a *Botrytis*, preferivelmente uma planta da espécie *S. lycopersicum*, caracterizado pelo fato de que dita transferência resulta na introdução de material genômico da planta doadora na região correspondente do genoma de dita uma ou mais plantas receptoras susceptíveis;

c) selecionar dentre ditas plantas de tomate receptoras (ou a partir de planta adicionalmente autopolinizada de retrocruzada obtida com dita planta de tomate receptora; i.e. a partir de plantas recombinantes obtidas depois de dita transferência) uma planta que compreenda dentro de seu genoma pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis* derivado de dita planta de tomate resistente a *Botrytis*, caracterizado pelo fato de que dita seleção compreende detectar em cromossoma 4, 6, 9, 11 e/ou 12 de dita planta de tomate receptora pelo menos um marcador genético ligado a dito pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis*

- caracterizado pelo fato de que a localização de dito QTL em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT50, C2At lg74970, P14M49-283e, P14M48-74e, P14M50-67e, CT1739 e P14M50-85h em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*, mais

preferivelmente em cromossoma 4 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em formas de realização preferidas, a localização de dito QTL em cromossoma 6 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P22M50-188h, P14M48-521e, P15M48-386h, P18M51-199h, P18M51-103h, P22M50-103e, P18M51-388e, P15M48-395e, P22M50-124e, P14M48-160e e P22M50-513h em cromossoma 6 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 6 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 6 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 6 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em outras formas de realização preferidas, a localização de dito QTL em cromossoma 9 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P18M50-141, P14M49-240, TG254, TG223, TG10, P18M50-134h, P14M49-243h, P18M50-599, P14M60-222h, P22M51-417h, P14M50-174h, P14M60-157h, P14M60-107h, P15M48-138h, P14M48-113h, Tm2a, P18M51-146h, P14M48-282h e P14M50-276h em cromossoma 9 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 9 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 9 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 9 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em ainda outras formas de realização preferidas, a localização de dito QTL em cromossoma 11 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P14M60-215e, P14M61-173h, P14M50-307h, TG47, P14M50-29xCD, P18M51-358h, P18M50-27xCD, P18M51-136h, P22M50-488h, TG393, P14M61-396h, P22M51-235h e P22M51-174e em cromossoma 11 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 11 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 11 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 11 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em ainda outras formas de realização preferidas, a localização

de dito QTL em cromossoma 12 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT19, TG68, P14M48-411e, P18M50-244h, P18M50-273h, P14M61-420h, P14M61-406h, P14M61-223h, P14M60-193h, P22M5 1-3 14h, TG565, P14M48-172h, P22M50-321e, P14M60-219e, P14M48-153h, P22M50-97h, TG296, P22M50-13 1h e P22M5 1-135h, preferivelmente por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P14M61-420h, P14M61-406h, P14M61-223h, P14M60-193h, P22M51-314h, TG565, P14M48-172h, P22M50-321e, P14M60-219e, P14M48-153h, P22M50-97h, TG296, e P22M50-131h em cromossoma 12 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 12 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 12 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 12 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

A transferência de ácido nucleico compreendendo pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis*, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, pode ser muito adequadamente realizada cruzando dita planta de tomate resistente a *Botrytis* com uma planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis* para produzir plantas descendentes.

Um método de seleção preferido, portanto compreende seleção auxiliada por marcador (MAS) (veja e.g. Tanksley et al. 1998) de dito DNA introgridido caracterizado pelo fato de que um ou mais marcadores associados com dito QTL são detectados em plantas descendentes. MAS pode, por exemplo, ser realizada isolando material genético de ditas plantas descendentes e determinando a presença nestas, por técnicas moleculares, de um ou mais marcadores de planta doadora. Alternativamente, métodos de detecção de marcador molecular podem ser usados sem isolamento anterior de material genético. Opcionalmente, em adição à detecção de marcador, um teste fenotípico em resistência a *Botrytis* pode ser realizado a fim de selecionar plantas adequadas. Um teste muito adequado, portanto é o bioensaio quantitativo como descrito neste lugar, através do qual tais

parâmetros como incidência de doença e/ou taxa de crescimento de lesão são determinados. A confirmação da presença de pelo menos um marcador de um QTL para resistência a *Botrytis* em combinação com o estabelecimento da presença de um fenótipo resistente fornece evidência da transferência bem sucedida de ácido nucleico compreendendo pelo menos um QTL, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, da planta doadora para a planta receptora.

Em uma forma de realização alternativa de um método de produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, a transferência de ácido nucleico indicada pode ser muito adequadamente realizada por métodos transgênicos (e.g. por transformação), por fusão de protoplastos, por uma técnica de haplóide duplicado ou por resgate de embriões.

Em uma forma de realização preferida de um método de produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, as plantas doadoras são *Solanum habrochaites* LYC 4/78 e o ácido nucleico transferido das mesmas plantas doadoras para plantas receptoras preferivelmente compreende pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis* selecionado a partir do grupo consistindo dos QTLs em cromossomas 4, 6, 9, 11 e/ou 12 de *Solanum habrochaites* LYC 4/78 associado com resistência a *Botrytis*, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo.

Em outra forma de realização preferida de um método de produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, o método compreende o cruzamento de dita planta de tomate resistente a *Botrytis* com uma planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis* para produzir plantas descendentes de primeira geração; selecionar dentre as plantas descendentes de primeira geração uma planta que compreenda em seu genoma ácido nucleico introgrado de dita planta de tomate doadora, caracterizado pelo fato de que dito ácido nucleico introgrado compreende pelo menos um QTL, preferivelmente dois, mais preferivelmente mais do que dois QTLs para

resistência a *Botrytis* de acordo com a invenção, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo; cruzar dita planta descendente selecionada com uma linhagem de tomate comercial adequada para produzir plantas descendentes de segunda geração; selecionar dentre as plantas descendentes de primeira geração uma planta que compreenda em seu genoma ácido nucleico introgridido de dita planta de tomate descendente de primeira geração, caracterizado pelo fato de que dito ácido nucleico introgridido compreende pelo menos um QTL, preferivelmente dois, mais preferivelmente mais do que dois QTLs para resistência a *Botrytis* de acordo com a invenção, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, e opcionalmente produzir gerações adicionais de plantas descendentes. Os preferivelmente dois mencionados, mais preferivelmente mais do que dois QTLs para resistência a *Botrytis* que são introgrididos em plantas descendentes podem ser QTLs para incidência de doença, QTLs para taxa de crescimento de lesão ou uma combinação destes tipos.

Em uma forma de realização mais preferida, etapa c) compreende selecionar uma planta que compreenda dentro de seu genoma pelo menos 4 QTLs para resistência a *Botrytis* selecionados a partir do grupo consistindo dos QTLs em cromossoma 1, 2, 4, 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites*, preferivelmente linhagem LYC 4/78, associados com resistência a *Botrytis*.

Em outro aspecto, a presente invenção se refere a uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, ou uma parte da mesma, viável por um método da presente invenção.

A presente invenção se refere adicionalmente a um QTL para resistência a *Botrytis* em tomate, caracterizado pelo fato de que dito QTL é selecionado a partir do grupo consistindo dos QTLs em cromossomas 4, 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites*, preferivelmente linhagem LYC 4/78, associado com resistência a *Botrytis*. Estes QTLs estão localizados em

posições do genoma não previamente associadas com resistência a *Botrytis*. Detalhes destes QTLs são descritos em mais detalhe neste lugar abaixo.

Os alelos presentes nas posições do genoma indicadas por estes QTLs são um aspecto da presente invenção.

5 Um QTL da presente invenção pode estar na forma de uma seqüência de ácidos nucleicos isolada, preferivelmente de dupla fita compreendendo dito QTL ou uma parte conferindo resistência do mesmo. Muito adequadamente, o tamanho da seqüência de ácidos nucleicos, que, por exemplo, pode ser isolada do cromossoma de uma planta doadora adequada, 10 pode representar uma distância genética de 1-100 cM, preferivelmente 10-50 cM em dito cromossoma. Dito ácido nucleico pode compreender pelo menos 50, mais preferivelmente pelo menos 500, ainda mais preferivelmente pelo menos 1000, ainda mais preferivelmente pelo menos 5000 pares de bases. Uma ou mais seqüências de ácidos nucleicos compreendendo um QTL ou 15 uma parte conferindo resistência do mesmo de acordo com a invenção podem estar por sua vez compreendidas em uma construção de ácido nucleico, dita construção pode compreender adicionalmente regiões que flanqueiam dito uma ou mais seqüências de ácidos nucleicos e cujas regiões são capazes de serem integradas em um vetor adequado para transferência de dita uma ou 20 mais seqüências de ácidos nucleicos em uma planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis* adequada. O vetor pode compreender adicionalmente regiões promotoras adequadas ou outras seqüências reguladoras. Os QTLs também podem estar em uma forma presente dentro do genoma de uma planta de tomate. Os QTLs da presente invenção preferivelmente compreendem pelo 25 menos um marcador, preferivelmente dois, mais preferivelmente três, ainda mais preferivelmente quatro, ainda mais preferivelmente mais do que quatro marcadores associados com resistência a *Botrytis* selecionados a partir do grupo consistindo dos marcadores de Tabelas 1 - 5 ligados a dito QTL.

A presente invenção se refere em outro aspecto a um método

para detectar um QTL para resistência a *Botrytis*, compreendendo detectar pelo menos um marcador ligado a um QTL para resistência a *Botrytis* em cromossoma 4, 6, 9, 11 e/ou 12 de uma planta de tomate resistente a *Botrytis* suspeita,

5                               - caracterizado pelo fato de que a localização de dito QTL em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT50, CZAtlg74970, P14M49-283e, P14M48-74e, P14M50-67e, CT1739 e P14M50-85h em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*, mais  
10 preferivelmente em cromossoma 4 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em uma forma de realização preferida de um método de detectar um QTL da presente invenção, a localização de dito QTL em cromossoma 6 de dita planta é indicada por uma região genômica  
15 compreendendo os marcadores genéticos P22M50-188h, P14M48-521e, P15M48-386h, P18M51- 199h, P18M5 1- 103h, P22M50- 103e, P18M51-388e, P15M48-395e, P22M50- 124e, P14M48- 160e e P22M50-513h em cromossoma 6 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 6 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 6 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em  
20 cromossoma 6 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em outra forma de realização preferida de um método de detectar um QTL da presente invenção, a localização de dito QTL em cromossoma 9 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P18M50-141, P14M49-240, TG254,  
25 TG223, TG10, P18M50-134h, P14M49-243h, P18M50-599, P14M60-222h, P22M51-417h, P14M50-174h, P14M60-157h, P14M60-107h, P15M48-138h, P14M48-113h, TmZa, P18M51-146h, P14M48-282h e P14M50-276h em cromossoma 9 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 9 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 9 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em

cromossoma 9 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em ainda outra forma de realização preferida de um método de detectar um QTL da presente invenção, a localização de dito QTL em cromossoma 11 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P14M60-215e, P14M61-173h, P14M50-307h, TG47, P14M50-29~CDP, 18M51-358h, P18M50-27xCD, P18M51-136h, P22M50-488h, TG393, P14M61-396h, P22M51-235h e P22M51-174e em cromossoma 11 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 11 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 11 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 11 de *S. lycopersicum* cv. Moneyraker.

Em ainda outra forma de realização preferida de um método de detectar um QTL da presente invenção, a localização de dito QTL em cromossoma 12 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT19, TG68, P14M48-411e, P18M50-244h, P18M50-273h, P14M61-420h, P14M61-406h, P14M61-223h, P14M60-193h, P22M51-314h, TG565, P14M48-172h, P22M50-321e, P14M60-219e, P14M48-153h, P22M50-97h, TG296, P22M50-131h e P22M51-135h, preferivelmente por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P14M61-420h, P14M61-406h, P14M61-223h, P14M60-193h, P22M51-314h, TG565, P14M48-172h, P22M50-321e, P14M60-219e, P14M48-153h, P22M50-97h, TG296, e P22M50-131h em cromossoma 12 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 12 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 12 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 12 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em um aspecto ainda adicional, a presente invenção se refere a uma planta resistente a *Botrytis* da espécie *S. lycopersicum*, ou uma parte da mesma, compreendendo dentro de seu genoma pelo menos um QTL, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, caracterizado pelo fato de

que dito QTL é selecionado a partir do grupo consistindo dos QTLs em cromossoma 4, 6,9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites*, preferivelmente linhagem LYC 4/78, associado com resistência a *Botrytis*, caracterizado pelo fato de que a localização de dito QTL em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT50, C2Atlg74970, P14M49-283e, P14M48-74e, P14M50-67e, CT1739 e P14M50-85h em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 4 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, caracterizado pelo fato de que dito QTL ou dita parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo não está em seu ambiente genético natural, e caracterizado pelo fato de que dita planta opcionalmente compreende adicionalmente um ou mais QTLs adicionais, ou partes conferindo resistência a *Botrytis* do mesmos, associado com resistência a *Botrytis* selecionados a partir dos QTLs em cromossoma 1, 2 e/ou 4 de *Solanum habrochaites*, preferivelmente de *Solanum habrochaites* linhagem LYC 4/78, caracterizado pelo fato de que a localização de dito QTL adicional em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P18M51-169.5e, P18M51-305.4h, P14M60-262.9e, P14M61-292.7h, TG609, P14M48-345e, P14M48-177e e P18M50-147e em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 4 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção se refere a um método de produzir uma planta de tomate congênita resistente a *Botrytis*. O método compreende as etapas de produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis* de acordo com um método da invenção como descrito acima, autofecundando dita planta, desenvolver semente obtida de dita planta autofecundada em novas plantas; identificar plantas que exibem resistência a

*Botrytis* e possuem características desejáveis comercialmente dentre ditas novas plantas, e repetindo as etapas de autopolinização e seleção até que seja produzida uma planta de tomate congênita que exiba resistência a *Botrytis* e possua características desejáveis comercialmente.

5 Um método de produzir uma planta de tomate congênita resistente a *Botrytis* pode compreender adicionalmente a etapa adicional de selecionar plantas de tomate congênicas homozigotas que exibem resistência a *Botrytis* e possuem características desejáveis comercialmente.

10 Em um aspecto adicional, a presente invenção se refere a uma planta de tomate congênita resistente a *Botrytis*, ou partes da mesma, viável por um método da invenção.

15 Em um aspecto adicional, a presente invenção se refere a uma planta de tomate híbrida, ou partes da mesma, que exibe resistência a *Botrytis*, caracterizado pelo fato de que dita planta de tomate híbrida é viável cruzando uma planta de tomate congênita resistente a *Botrytis* viável por um método da invenção com uma planta de tomate congênita que exibe características desejáveis comercialmente.

20 A invenção se refere adicionalmente a uma cultura de tecido de células regeneráveis das plantas de tomate da presente invenção. Em uma forma de realização preferida de uma tal cultura de tecido, as células ou protoplastos de ditas células foram isoladas de um tecido selecionado a partir do grupo consistindo de folhas, pólen, embriões, raízes, ápices radiculares, anteras, flores, frutos, e caules e sementes.

25 A invenção se refere adicionalmente ao uso de um marcador selecionado a partir do grupo consistindo dos marcadores de Tabelas 1 - 5 para a detecção de QTLs para resistência a *Botrytis* de acordo com a invenção, e/ou para a detecção de plantas de tomate resistentes a *Botrytis*.

A planta de tomate doadora resistente a *Botrytis* usada em métodos da presente invenção é preferivelmente selecionada a partir do grupo

consistindo de *Lycopersicon cerasiforme*, *Lycopersicon cheesmanii*,  
*Lycopersicon chilense*, *Lycopersicon chmielewskii*, *Lycopersicon*  
*lycopersicum*, *Lycopersicon habrochaites*, *Lycopersicon parviflorum*,  
*Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon*  
5 *pimpinellifolium* e *Solanum lycopersicoides*, mais preferivelmente, um acesso  
de tomate selvagem é usado como a planta doadora. Plantas doadoras  
altamente preferidas são *Solanum habrochaites*, em particular *Solanum*  
*habrochaites* LYC 4/78.

A planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis* usada em  
10 métodos da presente invenção é preferivelmente uma planta da espécie  
*Solanum lycopersicum*, mais preferivelmente um cultivar de *S. lycopersicum*  
que possui características desejáveis comercialmente, ou outra linhagem  
comercial de tomate.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

15 Figura 1 mostra a posição de loci de características  
quantitativas (QTLs) para resistência a *B. cinerea* originados de *S.*  
*habrochaites* LYC 4/78 com os mapas de ligação representando cromossoma  
4 (posição putativa de QTLs fornecida como seções escuras). Posições de  
mapa são dadas em cM. Os dados permitem identificação putativa de dois  
20 QTLs separados, um centrado em volta de marcador TG62 (veja Exemplo 1)  
e identificado em IL 4-1 em Exemplo 4, e outro separado deste não incluindo  
o marcador TG62, mas centrado em volta de marcador **P14M49-283e** e  
identificado em IL 4-3 em Exemplo 4. Os QTLs detectados em cromossoma 4  
diminuem tanto taxa de crescimento de lesão como incidência de doença. Os  
25 códigos para marcadores AFLP são mais extensivamente descritos em Tabela  
**1**. Todos os marcadores indicados como associados aos QTLs nas Figuras  
exemplificando a presente invenção podem ser usados como marcadores tanto  
individualmente assim como em combinação em aspectos da mesma.

Figura 2 mostra a posição do locus de característica

quantitativa (QTL) para resistência a *B. cinerea* originados de *S. habrochaites* LYC 4/78 com os mapas de ligação representando cromossoma 6 (posição putativa de QTL fornecida como seção escura). O QTL em cromossoma 6 diminui tanto taxa de crescimento de lesão como incidência de doença.

5                    Figura 3 mostra a posição do locus de característica quantitativa (QTL) para resistência a *B. cinerea* originados de *S. habrochaites* LYC 4/78 com os mapas de ligação representando cromossoma 9 (posição putativa de QTL fornecida como seção escura). O QTL em cromossoma 9 diminui tanto taxa de crescimento de lesão como incidência de doença. A  
10                    Figura mostra adicionalmente a introgressão em cromossoma 9 de IL Linhagens 11-2 e 12-3.

                    Figura 4 mostra a posição do locus de característica quantitativa (QTL) para resistência a *B. cinerea* originados de *S. habrochaites* LYC 4/78 com os mapas de ligação representando cromossoma 11 (posição  
15                    putativa de QTL fornecida como seção escura). O QTL em cromossoma 11 diminui tanto taxa de crescimento de lesão como incidência de doença. O mapa de ligação representa IL linhagem 11-2 de Exemplo 4.

                    Figura 5 mostra a posição dos loci de características quantitativas (QTLs) para resistência a *B. cinerea* originados de *S.*  
20                    *habrochaites* LYC 4/78 com os mapas de ligação representando cromossoma 12 (posição putativa de QTL fornecida como seção escura). Os QTLs em cromossoma 12 diminuem tanto taxa de crescimento de lesão como incidência de doença.

                    Figura 6 mostra o retrocruzamento e estratégia de seleção  
25                    usada para obter a população de *S. habrochaites* LYC 4/78 IL introgridida na constituição genética de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker descrito em Exemplo 4.

                    Figura 7 mostra o genótipo gráfico da população de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker x *S. habrochaites* linhagem de introgressão

LYC 4/78 usada em Exemplo 4. Todos os cromossomas são descritos para escala em segmentos de 20 cM de acordo com o mapa de ligação genética de F2. Algumas regiões são adicionadas às extremidades de Cromossomas 3, 4, 5 e 9 (marcadores CAPS). Introgessões homozigotas de *S. habrochaites* são apresentadas em preto, enquanto que introgessões heterozigotas são marcadas usando um padrão diagonal (cinza).

Figura 8 mostra a posição de loci de características quantitativas (QTLs) para resistência a *B. cinerea* originados de *S. habrochaites* LYC 4/78 com os mapas de ligação representando cromossoma 1, 2 e 4 e indica QTLs indicados neste pedido como QTL-1h, QTL-2h e QTL-4hA.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### Definições

Como usado neste lugar, o termo "*Botrytis*" significa *Botrytis cinerea*, também conhecido como mofo-cinzento ou mancha-cinzenta, uma doença comumente encontrada no caule, folhas e fruto de tomates. Geralmente é considerado que o fungo patogênico de planta *Sclerotinia sclerotiorum* tem um mecanismo de infecção similar àquele de *B. cinerea* (Prins et al., 2000). Embora infecção por *S. sclerotiorum* em tomate seja economicamente muito menos importante do que infecção por *B. cinerea*, ambos os fungos secretam um espectro de proteases, enzimas degradadoras de parede de célula vegetal, toxinas assim como ácido oxálico. Alguns destes fatores são conhecidos por desempenharem um papel na estratégia de infecção de ambos os fungos. Como um resultado, acredita-se que os mecanismos e genes que conferem resistência a *Botrytis* sejam igualmente efetivos em fornecer resistência à infecção por *S. sclerotiorum*. Portanto, quando é feita referência neste lugar a "resistência a *Botrytis*", tal resistência deve ser entendida como incluindo resistência a qualquer fungo da família *Sclerotiniaceae*, preferivelmente resistência a *S. sclerotiorum* e *B. cinerea*,

mais preferivelmente resistência a *B. cinerea*.

Como usado neste lugar, o termo "alelo(s)" significa qualquer uma ou mais das formas alternativas de um gene, todos os tais alelos se referem a pelo menos um traço ou característica. Em uma célula ou organismo diplóide, os dois alelos de um dado gene ocupam loci correspondentes em um par de cromossomas homólogos. Uma vez que a presente invenção se refere a QTLs, i.e. regiões genômicas que podem compreender um ou mais genes, mas também seqüências reguladoras, isto é em algumas instâncias mais acurado para se referir a "haplótipo" (i.e. um alelo de um segmento cromossômico) ao invés de "alelo", entretanto, em tais instâncias, o termo "alelo" deve ser entendido como compreendendo o termo "haplótipo".

Um "gene" é definido neste lugar como uma unidade hereditária consistindo de uma seqüência de DNA que ocupa uma localização específica em um cromossoma e que contém a instrução genética para uma característica ou traço particular em um organismo.

Um "locus" é definido neste lugar como a posição que um dado gene ocupa em um cromossoma de uma dada espécie.

Como usado neste lugar, o termo "heterozigoto" significa uma condição genética existindo quando alelos diferentes residem em loci correspondentes em cromossomas homólogos.

Como usado neste lugar, o termo "homozigoto" significa uma condição genética existindo quando alelos idênticos residem em loci correspondentes em cromossomas homólogos.

Como usado neste lugar, o termo "híbrido" significa qualquer descendência de um cruzamento entre dois indivíduos geneticamente diferentes, incluindo mas não limitado ao cruzamento entre duas linhagens congênicas.

Como usado neste lugar, o termo "congênita" significa um

indivíduo ou linhagem substancialmente homozigoto.

Neste pedido um "evento de recombinação" é entendido como significando um "cruzamento genético" meiótico.

5 Como usado neste lugar, os termos "introgressão", "introgridido" e "introgridir" se referem tanto a um processo natural como artificial através do qual genes de uma espécie, variedade ou cultivar são movidos para o genoma de outra espécie, variedade ou cultivar, cruzando tais espécies. O processo opcionalmente pode ser completado por retrocruzamento com o genitor recorrente.

10 "Engenharia genética", "transformação" e "modificação genética" são todos usados neste lugar como sinônimos para a transferência de genes isolados e clonados para o DNA, normalmente o DNA cromossômico ou genoma, de outro organismo.

15 Como usado neste lugar, o termo "marcador molecular" se refere a um indicador que é usado em métodos para visualizar diferenças em características de seqüências de ácidos nucleicos. Exemplos de tais indicadores são marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), polimorfismos de nucleotídeos únicos  
20 (SNPs), marcadores microssatélites (e.g. SSRs), marcadores de região amplificada caracterizada por seqüência (SCAR), marcadores de seqüência polimórfica amplificada clivada (CAPS) ou marcadores de isozima ou combinações dos marcadores descritos neste lugar o que define uma localização genética e cromossômica específica.

25 Os termos "resistente" e "resistência" abrangem tanto resistência parcial como total a infecção. Uma planta de tomate susceptível a *Botrytis* pode ou não ser resistente ou ter baixos níveis de resistência a infecção por *Botrytis*.

Como usado neste lugar, o termo "parte vegetal" indica uma



<http://www.sgn.cornell.edu/help/about/solanum.nomenclature.html>).

É especialmente observado que *S. habrochaites* pode ser definida como uma espécie de tomate que carrega frutos peludos, enquanto que *S. lycopersicum* é uma espécie de tomate carregando frutos sem pelos.

5            Como usado neste lugar, o termo “variedade” ou “cultivar” significa um grupo de plantas similares que por características estruturais ou genéticas e/ou desempenho podem ser distinguidas de outras variedades dentro da mesma espécie.

10            O termo “QTL” é usado neste lugar em seu significado reconhecido na arte. O termo “QTL associado com resistência a *B. cinerea* em tomate” assim como o termo mais curto “QTL para resistência a *Botrytis*” se refere a uma região localizada em um cromossoma particular de tomate que está associada com pelo menos um gene que codifica para resistência a *Botrytis* ou pelo menos uma região reguladora, i.e. uma região de um  
15 cromossoma que controla a expressão de um ou mais genes envolvidos em resistência a *Botrytis*. A expressão fenotípica de tal gene, por exemplo, pode ser observada como uma taxa de crescimento de lesão reduzida e/ou como uma incidência de doença reduzida. Um QTL pode, por exemplo, compreender um ou mais genes cujos produtos conferem a resistência  
20 genética. Alternativamente, um QTL pode, por exemplo, compreender genes reguladores ou seqüências cujos produtos influenciam a expressão de genes em outros loci no genoma da planta com isso conferindo a resistência a *Botrytis*. Os QTLs da presente invenção podem ser definidos indicando sua localização genética no genoma do respectivo acesso de tomate selvagem  
25 usando um ou mais marcadores genômicos moleculares. Um ou mais marcadores, por sua vez, indicam um locus específico. Distâncias entre loci normalmente são medidas por freqüência de sobre cruzamento das cromátides homólogas não-irmãs entre loci no mesmo cromossoma. Quanto mais afastados dois loci são, mais provável que um sobre cruzamento ocorra entre

eles. Inversamente, se dois loci estão muito próximos, é menos provável que um sobrecruzamento ocorra entre eles. Como uma regra, um centimorgan (cM) é igual a 1% de recombinação entre loci (marcadores). Quando um QTL pode ser indicado por múltiplos marcadores a distância genética entre os marcadores de extremidade é indicativa do tamanho do QTL.

O termo "planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis*" é usado neste lugar para indicar uma planta de tomate que deve receber DNA obtido a partir de uma planta de tomate doadora que compreende um QTL para resistência a *Botrytis*. Dita "planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis*" pode ou não já compreender um ou mais QTLs para resistência a *Botrytis*, em cujo caso o termo indica uma planta que deve receber um QTL adicional.

O termo "constituição genética natural" é usado neste lugar para indicar a constituição genética original de um QTL. Uma tal constituição pode, por exemplo, ser o genoma de um acesso selvagem de resistência a *Botrytis* de tomate. Por exemplo, os QTLs da presente invenção foram encontrados em localizações específicas em cromossomas 4, 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites* LYC 4/78. Como um exemplo, um *Solanum habrochaites* LYC 4/78 representa a constituição genética natural dos QTLs em cromossomas 4, 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites* LYC 4/78. Também o *Solanum habrochaites* LYC 4/78 representa a constituição genética natural de ditos QTLs. Reciprocamente, um método que envolve a transferência de DNA compreendendo o QTL, ou uma parte conferindo resistência do mesmo, de cromossomas 4 de *Solanum habrochaites* LYC 4/78 para a mesma posição em cromossoma 4 de outra espécie de tomate, mais notavelmente *S. lycopersicum*, irá resultar em tal QTL, ou dita parte conferindo resistência do mesmo, não estando em sua constituição genética natural.

O termo "incidência de doença" é definido neste lugar como o

parâmetro que reflete a capacidade da planta de reduzir o estabelecimento de uma infecção e pode, por exemplo, ser estabelecida determinando o sucesso de atingir infecção da planta mediante contato com o agente infeccioso.

5 O termo "taxa de crescimento de lesão" ou "taxa de crescimento de lesão" é definido neste lugar como o parâmetro que reflete a capacidade da planta de tornar mais lenta ou reduzir a progressão de infecção, e pode, por exemplo, ser estabelecido determinando a taxa de crescimento de lesões em expansão.

10 O termo "determinar quantitativamente" é definido neste lugar como estabelecer ou verificar de uma maneira envolvendo mensuração, em particular a mensuração de aspectos mensuráveis em termos de quantidades e número. Determinações em graus de severidade e indicações de maior, mais, menos, ou igual ou de magnitude crescente ou decrescente, não estão compreendidas no presente termo "determinar quantitativamente", cujo termo  
15 essencialmente implica a presença de mecanismo objetivo de contagem para determinar valores absolutos. Portanto "determinar quantitativamente incidência de doença e/ou taxa de crescimento de lesão" preferivelmente compreende determinar a porcentagem de todos os contatos potencialmente infecciosos entre planta e agente infeccioso que resulta em lesões mensuráveis  
20 (a fim de verificar a incidência de doença), e/ou determinar o aumento em diâmetro, circunferência, área superficial ou volume de uma ou mais de ditas lesões com o tempo em condições favoráveis para crescimento fúngico (a fim de verificar a taxa de crescimento de lesão).

25 O termo "condições de prática padrão", "condições de casa de vegetação padrão" e "condições padrão" se referem às condições de luz, umidade, temperatura, etc. sob as quais plantas são cultivadas ou incubadas, por exemplo, para o propósito de caracterização fenotípica de resistência a doença, como sendo padrão. Para casas de vegetação, por exemplo, isto se refere a 16-h dia, 15°C-25°C. Mais em geral, os termos se referem a condições

de crescimento padrão e de referência com um fotoperíodo de 8 a 24 h (fluxo de fótons fotossintéticos (PPF) 50 a 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), preferivelmente um regime de luz de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, uma temperatura de ar de cerca de 19°C durante o dia e 15°C a noite, um déficit de pressão de vapor de água de cerca de 4,4 g  $\text{m}^{-3}$  correspondendo a uma umidade relativa (RH) de cerca de 60%-85%, a 600-700 ppm  $\text{CO}_2$  e concentração de  $\text{O}_2$  atmosférico e em pressão atmosférica do ar (geralmente 1008 hPa). Água e nutrientes podem ser dados em gotas perto do caule, ou na forma de líquido pulverizável ou vapor. Condições de experimentação de bioensaio padrão, tal como ensaio de comprimento de lesão de caule, medidas de incidência de doença e taxa de crescimento de lesão, são especificadas adicionalmente nos Exemplos abaixo. Em mais detalhe, o ensaio de comprimento médio de lesão de caule deve ser realizado como descrito em Exemplos 3.10 e 3.11.

#### Identificação de QTLs associado com resistência a *Botrytis* em tomate

Sabe-se que espécies selvagens de tomate fornecem fontes adequadas para características de resistência à doença e peste e a presença de resistência parcial a *B. cinerea* em folhas de espécies selvagens de tomate foi documentada (Urbasch, 1986). Dois fatores atrasaram o melhoramento para resistência a *B. cinerea* em tomate no passado. Primeiramente, cruzar resistência parcial em linhagens comerciais encontrou sucesso limitado. Secundariamente, havia carência de ensaios de doença confiáveis e reprodutíveis que poderiam possibilitar a identificação e localização de material genético responsável por conferir resistência.

Urbasch (Urbasch, 1986), por exemplo, infectou folhas com micélio usando tampões de ágar fornecendo o fungo com um excesso de nutrientes, o que afetou fortemente o processo de infecção. Outros pesquisadores usaram índices subjetivos de doença vegetal, que são inadequados para análise quantitativa requerida para a identificação de loci de

características quantitativas (QTLs).

Infecção por *Botrytis cinerea* em *Solanum lycopersicum* em condições de laboratório é relativamente bem estudada (e.g. Benito et al., 1998). Inoculação de gotícula de folhas e subsequente incubação em 5 temperaturas moderadas (15-20°C) resultam em um rápido desenvolvimento (16-24 h após infecção (hpi)) de manchas necróticas no sítio do inóculo. Infecção é temporariamente restrita neste ponto por aproximadamente 48 h. Deste momento em diante uma proporção das lesões (normalmente 5-10%) começa a se expandir. Crescimento das 10 mesmas assim chamadas "lesões em expansão" é acompanhado por um aumento em biomassa fúngica e resulta em colonização do folíolo completo nas próximas 48 h.

Foi encontrado anteriormente que QTLs específicos associados com resistência a *Botrytis* em tomate podem ser identificados 15 quando um bioensaio para medir resistência é usado caracterizado pelo fato de que a taxa da progressão de infecção e ou o sucesso de atingir infecção mediante contato com o agente infeccioso são medidos quantitativamente em partes da planta de tomate, preferivelmente em partes separadas, mais preferivelmente em segmentos de caule.

20 Em adição um teste pode ser usado como descrito em Exemplo 4, caracterizado pelo fato de que resistência de plantas inteiras é estudada e caracterizado pelo fato de que o caule foi mecanicamente ferido, e inóculo de *Botrytis* foi aplicado à ferida.

25 Ao usar linhagens de introgressão, cada uma contendo um segmento de introgressão específico do genoma de *S. habrochaites* LYC 4/78 em um perfil de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, os requerentes surpreendentemente foram capazes de descobrir QTLs ainda adicionais associados com resistência a *Botrytis* em *S. habrochaites* LYC 4/78. Assim, a presente invenção agora fornece um método para produzir uma planta de

tomate cultivada que é resistente a *Botrytis*, compreendendo:

- produzir uma série de linhagens de introgressão de tomate cultivado, caracterizado pelo fato de que cada linhagem de introgressão contém uma introgressão genômica específica (uma região cromossômica) de um acesso de tomate selvagem resistente a *Botrytis*, preferivelmente *S. habrochaites* LYC 4/78, e cujas séries juntas cobrem o genoma de dito acesso de tomate selvagem resistente;

- identificar QTLs associados com resistência a *Botrytis* em plantas de cada uma das ditas linhagens de introgressão individuais realizando um bioensaio quantitativo para medir resistência a *Botrytis* em plantas de cada uma de ditas linhagens de introgressão individuais, preferivelmente medindo incidência de doença e/ou a taxa de crescimento de lesão, e estabelecendo um mapa de ligação genética que liga a resistência observada a *Botrytis* com a presença de marcadores cromossômicos em ditas linhagens de introgressão e designando marcadores contíguos em dito mapa que são ligados a uma resistência acentuada (e.g. uma incidência reduzida de doença e/ou uma taxa reduzida de crescimento de lesão) a um locus de característica quantitativa;

- e usar uma linhagem de introgressão que contém um QTL associado com resistência a *Botrytis* para a produção de uma planta de tomate cultivada que é resistente a *Botrytis*, ou usar a informação de marcador para os QTLs assim identificados em seleção auxiliada por marcador de plantas de tomate resistentes a *Botrytis* suspeitas.

Surpreendentemente foi encontrado que múltiplos QTLs para resistência a *Botrytis* estavam presentes nos genomas de plantas de tomate resistentes a *Botrytis*, ao passo que os métodos de arte anterior resultaram na identificação por tentativa de QTLs em cromossomas 1,2, 4 e 10. Além disso, os QTLs que foram encontrados usando os presentes métodos foram

localizados em cromossomas não previamente associados com resistência a *Botrytis* de plantas de tomate, mesmo quando usando uma constituição genética similar (Patente Internacional 021085105) Portanto, os métodos da presente invenção forneceram a percepção adicional de que o uso em ILS  
5 pode resultar em investigação mais detalhada da origem genética de resistência a *Botrytis* em tomate e pode resultar na identificação de material cromossômico envolvido em tal resistência não identificada previamente com este.

Um método para detectar um locus de característica  
10 quantitativa (QTL) associado com resistência a *Botrytis* em tomate de acordo com a presente invenção, de outra maneira destinável como método para identificar ou localizar um locus de característica quantitativa (QTL), requer a disponibilidade de uma planta de tomate resistente (parcialmente) a *Botrytis*. Uma tal planta pode ser fornecida por qualquer meio conhecido na arte, e  
15 usando qualquer método para a determinação da presença de dita resistência (parcial) em dita planta. A provisão de uma planta de tomate resistente (parcialmente) a *Botrytis* (a qual irá servir adicionalmente como uma planta doadora em um método da presente invenção) possibilita o estabelecimento ou provisão de marcadores cromossômicos, preferivelmente marcadores  
20 AFLP, CAPS e/ou SCAR, mais preferivelmente marcadores CAPS e/ou SCAR, para pelo menos um, mas preferivelmente para todos os cromossomas de dita planta. Estabelecendo uma coleção de marcadores cromossômicos ao longo de todo o comprimento de ditos cromossomas, as várias localizações de ditos cromossomas podem ser efetivamente marcadas. Tais métodos são bem  
25 conhecidos na arte e métodos exemplares serão descritos em mais detalhe neste lugar abaixo.

Um método para detectar um locus de característica quantitativa (QTL) associado com resistência a *Botrytis* em tomate em conformidade com a presente invenção pode compreender a etapa de medir a

resistência a *Botrytis* em uma planta. Sobre este assunto, uma planta é colocada em contato com uma quantidade inefetiva de *Botrytis*. Uma tal quantidade pode variar entre plantas e entre espécies fúngicas testadas. Normalmente uma quantidade de cerca de 1 a 10 para uma quantidade de cerca de 500-5000 conídios de dito fungo será suficiente.

Medir a resistência a *Botrytis* pode compreender determinar quantitativamente a incidência de doença e/ou a taxa de crescimento de lesão em uma planta.

A etapa de colocar em contato uma planta com uma quantidade inefetiva de *Botrytis* e determinar quantitativamente a resistência preferivelmente é realizada como parte de um bioensaio de resistência em segmentos de caule ou folhas como descrito neste lugar, preferivelmente um bioensaio de resistência em segmentos de caule mais preferivelmente em plantas inteiras como descrito em Exemplo 4. A pessoa versada na arte irá entender que variações destes ensaios como descritas neste lugar abaixo são possíveis.

Um bioensaio de resistência em segmentos de caule pode ser realizado essencialmente como segue: Primeiro, sementes para as plantas descendentes são plantadas e cultivadas até plântulas/plantas de adequadamente aproximadamente 50 cm de altura. O topo 5-10 cm e fundo 5-10 cm do caule das plantas podem ser removidos e os 30 cm remanescentes podem ser cortados em segmentos iguais de 5-6 cm. Os segmentos de caule são preferivelmente colocados virados para cima em um látice com a base de caule em papel filtro úmido. Antes de inoculação, os segmentos de caule são adequadamente pulverizados com água a fim de assegurar uma distribuição igual do inóculo pela superfície de ferida. Cada segmento de caule pode então ser inoculado por uma suspensão conidial de *B. cinerea*. Uma quantidade adequada de inóculo, por exemplo, uma gota de cerca de 5  $\mu$ l, compreendendo aproximadamente 106 conídios ml<sup>-1</sup>, pode, além disso, ser

aplicada no topo de cada segmento de caule. Os segmentos de caule são então incubados em uma temperatura de adequadamente cerca de 16 °C, preferivelmente no escuro, e preferivelmente em alta umidade (e.g. **100%** RH). Progresso de infecção pode ser determinado quantitativamente medindo o avanço máximo de sintoma de decomposição em vários intervalos de tempo depois de inoculação com um compasso de calibre Vernier. Em diversos intervalos de tempo adequados, por exemplo em 96, **120** e **144** horas após infecção (hpi), os caules então podem ser inspecionados para formação de lesão (incidência de doença) e crescimento de lesão, de uma maneira quantitativa. Parâmetros muito adequados compreendem a mensuração do tamanho da lesão, por exemplo usando um compasso de calibre. A fim de corrigir a variação causada pela estação ou cultivo das plantas, as medidas quantitativas dos bioensaios podem ser relacionadas às medidas comparáveis em linhagens de controle ou referência susceptíveis. A incidência de doença pode ser adequadamente determinada dividindo o número total de lesões em expansão pelo número total de gotículas de inoculação. A proporção de lesões em expansão em um genótipo particular pode ser então dividida pela proporção de lesões em expansão observada em um genótipo de controle ou referência e expressa como uma porcentagem. Alternativamente, ou adicionalmente, taxas de crescimento de lesão podem ser determinadas calculando o aumento em tamanho de lesão (e.g. em mm) por um período adequado, por exemplo por um período de **24** h. Dados para as lesões que não estão em expansão podem ser deletados da análise quantitativa. A taxa de crescimento de lesão obtida pode ser então opcionalmente dividida pela taxa de crescimento de lesão observada em um genótipo de controle ou referência e expressa como uma porcentagem ou como uma figura absoluta, por exemplo em milímetros.

Alternativamente, plantas podem ser monitoradas usando um bioensaio de infecção foliar como segue: Primeiro, sementes de tomate são

plantadas e cultivadas até plântulas/plantas. Para cada planta individual uma ou duas folhas compostas podem ser cortadas do caule principal e transferidas para espuma de florista pré-umedecida. A espuma de florista é então colocada em uma placa de Petri contendo água de torneira e subseqüentemente colocada em um recipiente umedecido com líquido pulverizável contendo papel filtro úmido. Um inóculo adequado compreendendo conídios de *B. cinerea* pode ser preparado por métodos conhecidos na arte, por exemplo, como descrito por Benito et al., 1998. As folhas compostas são então inoculadas com a suspensão conidial de *B. cinerea* colocando diversas gotículas, adequadamente, por exemplo, 6 a 10 gotículas de 2 µl cada, na superfície superior das folhas. O recipiente é então fechado e as folhas são incubadas em uma temperatura de adequadamente entre 15°C-20°C, preferivelmente no escuro, e preferivelmente em alta umidade. Em diversos intervalos de tempo adequados, por exemplo, em 96, 120 e 144 hpi, as folhas então podem ser inspecionadas para incidência de doença e crescimento de lesão, de uma maneira quantitativa como descrito acima para o bioensaio de caule.

Um método para detectar um locus de característica quantitativa (QTL) associado com resistência a *Botrytis* em tomate de acordo com a presente invenção compreende as etapas de estabelecer um mapa de ligação genética que liga a resistência observada com a presença de marcadores cromossômicos da planta de tomate doadora nas plantas receptoras dos ILs e determinando marcadores contíguos em dito mapa que são ligados a uma resistência acentuada a um locus de característica quantitativa.

Um mapa de ligação genética que liga a resistência acentuada observada com a presença de marcadores cromossômicos da planta de tomate doadora em ditas plantas IL pode ser estabelecido por qualquer método conhecido na arte. A pessoa versada está ciente de métodos para identificar

marcadores moleculares ligados a loci de características quantitativas de resistência (QTLs) e o mapeamento destes marcadores em um mapa de ligação genética (veja e.g. Bai et al., 2003; Foolad et al., 2002; van Heusden et al., 1999). A associação entre o fenótipo resistente a *Botrytis* e genótipo de marcador pode ser adequadamente realizada usando tais pacotes de aplicativos computacionais como JoinMap e MapQTL (veja Exemplos) ou qualquer pacote estatístico padrão que pode realizar análise de análise de variância. Os marcadores moleculares podem ser usados para construir mapas de ligação genética e para identificar loci de características quantitativas (QTLs) para resistência a *Botrytis*. Tipos adequados de marcadores moleculares e métodos para obter estes são descritos em mais detalhe neste lugar abaixo.

#### Marcadores moleculares e QTLs

Marcadores moleculares são usados para a visualização de diferenças em seqüências de ácidos nucleicos. Esta visualização é possível devido a técnicas de hibridização de **DNA-DNA** (RFLP) e/ou devido a técnicas usando a reação em cadeia da polimerase (e.g. STS, microssatélites, AFLP). Todas as diferenças entre dois genótipos parentais irão segregar ao mapear população (e.g., BCi, F2; veja Figura 2) baseado no cruzamento destes genótipos parentais. A segregação dos diferentes marcadores pode ser comparada e freqüências de recombinação podem ser calculadas. As freqüências de recombinação de marcadores moleculares em diferentes cromossomas é geralmente 50%. Entre marcadores moleculares localizados no mesmo cromossoma a freqüência de recombinação depende da distância entre os marcadores. Uma baixa freqüência de recombinação corresponde a uma curta distância entre marcadores em um cromossoma. Comparando todas as freqüências de recombinação irá resultar na ordem mais lógica dos marcadores moleculares nos cromossomas. Esta ordem mais lógica pode ser descrita

em um mapa de ligação (Paterson, 1996). Um grupo de marcadores adjacentes ou contíguos no mapa de ligação que está associado a uma incidência de doença reduzida e/ou uma taxa de crescimento de lesão reduzida detalha exatamente a posição de um QTL.

5                   Mediante a identificação do QTL, o efeito de QTL (a resistência) pode, por exemplo, ser confirmado verificando resistência a *Botrytis* em progênies BCzSi segregando para os QTLs sob investigação. A verificação da resistência a *Botrytis* pode ser adequadamente realizada usando um bioensaio de caule ou folha como descrito neste lugar.

10                   Os QTLs para resistência contra *Botrytis* em tomate viáveis usando um método da invenção são um aspecto da presente invenção. Uma característica de tais QTLs é que, quando presentes em plantas, eles são indicativos da presença de uma incidência de doença reduzida e/ou uma taxa de crescimento de lesão reduzida mediante o contato de dita  
15 planta com quantidade inefetiva de material de *Botrytis*, cujo material pode ser fornecido em qualquer forma, tal como na forma de conídios ou micélio.

A presente invenção também se refere a um QTL para resistência contra *Botrytis* em tomate, caracterizado pelo fato de que dito QTL  
20 é selecionado a partir do grupo consistindo dos QTLs em cromossomas 4, 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites* LYC 4/78 associado com resistência a *Botrytis*. Estes QTLs podem ser mais claramente definidos ou indicados pelos marcadores listados em Tabelas 1 - 5. Nestas tabelas, a região genômica onde os QTLs estão localizados é indicada pelos marcadores AFLP listados. Os  
25 QTLs da presente invenção compreendem informação genética na forma de DNA responsável por conferir incidência de doença *Botrytis* (parcial) e/ou uma taxa reduzida de crescimento de lesão de *Botrytis* em uma planta de tomate. A informação genética pode, por exemplo, compreender um gene ou um elemento regulador.

**Tabela 1.** QTLs encontrados em cromossoma 4 em descendência de um cruzamento de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker x *S. habrochaites* LYC 4/78 e informação de resistência quantitativa relacionada. Plantas de *S. Lycopersicum* cv. Moneymaker susceptíveis mostraram em média uma taxa de crescimento de lesão de 4,6 mm/dia e uma incidência de doença média de  $73 \pm 6,4$  % (Veja tabelas 8 e 9).

QTL	Marcador <sup>1*</sup>	Cromossoma	Taxa de crescimento de lesão <sup>2</sup> (mm/dia)	Incidência da doença <sup>2</sup> (%)
QTL-4hA	P18M51-156h P14M48-158h TG609 <sup>3</sup> P22M50-158h P14M61-215h P14M48-349h P14M61-237e P14M48-345e P14M50-124e P14M61120e TG62 <sup>4</sup> T1405 <sup>5</sup> TG555 <sup>6</sup> CT50 <sup>7</sup> C2At1g74970 <sup>8</sup>	4	2,5	41 ± 6,4
QTL-4hB	CT50 C2At1g74970 P14M49-283e P14M48-74e P14M50-67c CT173 <sup>9</sup> P14M50-85h	4	2,8	51 ± 9,6

<sup>1</sup>Nomenclatura de marcador: Códigos pelos quais a combinação de iniciadores de AFLP é comumente indicada, e.g. P18M51-156h, caracterizado pelo fato de que P e M são as seqüências comuns de iniciador *PstI* e *MseI* ou iniciadores universais (Vos *et al.*, 1995; Bai *et al.*, 2003) seguidas por 2 ou 3 bases seletivas extras como indicado por um código de extensão de dois dígitos. Códigos de extensão de dois dígitos são como segue: 14: AT; 15: CA; 18: CT; 22: GT; 48: CAÇ; 49: CAG; 50: CAT; 51: CCA; 60: CTC; 61: CTG. 156h é o tamanho aproximado em pares de bases do fragmento polimórfico resultante (tamanho dado \* 2 pares de base). O tamanho normalmente é arredondado, mas também pode ser dado em decimais. Este fragmento é amplificado ou em *S. lycopersicum* cv Moneymaker (e) ou *S. habrochaites* LYC 4/78 (h). Presença de um marcador indica que pelo menos um alelo da origem indicada está presente. Seqüências de iniciador e adaptador são descritas em detalhe por Bai *et al.* 2003.2 Incidência de doença e crescimento de lesão são

determinados usando métodos como explicado em detalhe nos Exemplos. 3TG609: veja Tabela 10.4TG62: Veja Tabela 11.5T1405: veja Tabela 20.6 TG555: veja Tabela 12. 7CT50: veja Tabela 13.8C2-Atlg74970: veja Tabela 14.9CT173: veja Tabela 21.

**Tabela 2.** QTLs encontrados em cromossoma 6 em descendência de um cruzamento de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker x *S. habrochaites* LYC 4/78 e informação de resistência quantitativa relacionada. Plantas de *S. Lycopersicum* cv. Moneymaker susceptíveis mostraram em média uma taxa de crescimento de lesão de 4,6 mm/dia e uma incidência de doença média de  $73 \pm 6,4$  %. Veja Tabela 1 para observações.

QTL	Marcador <sup>1*</sup>	Cromossoma	Taxa de crescimento de lesão <sup>2</sup> (mm/dia)	Incidência da doença <sup>2</sup> (%)
QTL-6h	P22M50-188h P14M48-521e P15M48-386h P18M51-199h P18M51-103h P22M50-103e P18M51-388e P15M48-395e P22M50-124e P14M48-160e P22M50-513h	6	3,6	49 ± 6,5

**Tabela 3.** QTLs encontrados em cromossoma 9 em descendência de um cruzamento de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker x *S. habrochaites* LYC 4/78 e informação de resistência quantitativa relacionada. Plantas de *S. Lycopersicum* cv. Moneymaker susceptíveis mostraram em média uma taxa de crescimento de lesão de 4,6 mm/dia e uma incidência de doença média de  $73 \pm 6,4$  %. Veja Tabela 1 para observações.

QTL	Marcador <sup>1*</sup>	Cromossoma	Taxa de crescimento da lesão <sup>2</sup> (mm/dia)	Incidência da doença <sup>2</sup> (%)
QTL-9h	P18M50-141 P14M49-240 TG254 <sup>1</sup> TG223 <sup>2</sup> TG10 <sup>3</sup> P18M50-134h P14M49-243h P18M50-599 P14M60-222h P22M51-417h P14M50-174h P14M60-157h P14M60-107h P15M48-138h P14M48-113h Tm2a <sup>4</sup> P18M51-146h P14M48-282h P14M50-276h	9	3,0-3,1	49 ± 6,4 – 69 ± 6,5

<sup>1</sup>TG254: veja Tabela 22. <sup>2</sup>TG223: veja Tabela 23. <sup>3</sup>TG10: veja Tabela 17. <sup>4</sup>Tm2a: veja Tabela 18 ou Sorbir, O.T. et al. (2000).

**Tabela 4.** QTLs encontrados em cromossoma 11 em descendência de um cruzamento de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker x *S. habrochaites* LYC 4/78 e informação de resistência quantitativa relacionada. Plantas de *S. Lycopersicum* cv. Moneymaker susceptíveis mostraram em média uma taxa de crescimento de lesão de 4,6 mm/dia e uma incidência de doença média de 73 ± 6,4 %. Veja Tabela 1 para observações.

QTL	Marcador <sup>1*</sup>	Cromossoma	Taxa de crescimento da lesão <sup>2</sup> (mm/dia)	Incidência da doença <sup>2</sup> (%)
QTL-11h	P14M60-215e P14M61-173h P14M50-307h TG47 P14M50-29xCD P18M51-358h P18M50-27xCD P18M51-136h P22M50-488h TG393 P14M61-396h P22M51-235h P22M51-174e	11	3,2	34 ± 6,4

<sup>1</sup>TG47: veja Tabela 24. <sup>2</sup>TG393: veja Tabela 25

**Tabela 5.** QTLs encontrados em cromossoma 12 em descendência de um cruzamento de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker x *S. habrochaites* LYC 4/78 e informação de resistência quantitativa relacionada. Plantas de *S. Lycopersicum* cv. Moneymaker susceptíveis mostraram em média uma taxa de crescimento de lesão de 4,6 mm/dia e uma incidência de doença média de 73 ± 6,4 %. Veja Tabela 1 para observações.

QTL	Marcador <sup>1*</sup>	Cromossoma	Taxa de crescimento de lesão <sup>2</sup> (mm/dia)	Incidência da doença (%)
QTL-12h	CT19 TG68 P14M48-411e P18M50-244h P18M50-273h P14M61-420h P14M61-406h P14M61-223h P14M60-193h P22M51-314h TG565 P14M48-172h P22M50-321e P14M60-219e P14M48-153h P22M50-97h TG296 P22M50-131h P22M51-135h	12	2,3	24 ± 8,6

<sup>1</sup>CT19: veja Tabela 26. <sup>2</sup>TG68: veja Tabela 27. TG565: veja Tabela 28.

15 TG296: veja Tabela 29

Mais confiavelmente, a região genômica onde QTL-4hA está localizado é posicionada entre marcadores P18M51-156h e C2-Atlg74970 (Tabela 14) como mostrado em Figura 1. Portanto, qualquer marcador localizado dentro de tal região pode ser usado para verificar a presença do QTL no genoma de uma planta, assim como qualquer marcador conhecido por ser localizado em tal região baseado em informação publicamente disponível, tal como a partir de mapas consenso Tomate-EXPEN 1992 (Tanksley *et al.*, 1992), Tomate-EXHIR 1997 (Bernacchi and Tanksley, 1997), Tomate-EXPEN 2000 (Fulton *et al.*, 2002) ou Tomate-EXPIMP 2001 (Grandillo and Tanksley, 1996; Tanksley *et al.* 1996, Doganlar *et al.* 2002).

Mais confiavelmente, a região genômica onde QTL-4hB está localizado, é posicionada entre marcadores CT50 (Tabela 13) e P14M50-85h como mostrado em Figura 1. Portanto, qualquer marcador localizado dentro de tal região pode ser usado para verificar a presença do QTL no genoma de uma planta, assim como qualquer marcador conhecido por ser localizado em tal região baseado em informação publicamente disponível.

Mais confiavelmente, a região genômica onde QTL-6h está localizado, é posicionada entre marcadores P22M50-188h e P22M50-513h como mostrado em Figura 2. Portanto, qualquer marcador localizado dentro de tal região pode ser usado para verificar a presença do QTL no genoma de uma planta, assim como qualquer marcador conhecido por ser localizado em tal região baseado em informação publicamente disponível.

Mais confiavelmente, a região genômica onde QTL-9h está localizado, é posicionada entre marcadores P18M50-141 e P14M50-276h como mostrado em Figura 3. Portanto, qualquer marcador localizado dentro de tal região pode ser usado para verificar a presença do QTL no genoma de uma planta, assim como qualquer marcador conhecido por ser localizado em tal região baseado em informação publicamente disponível.

Mais confiavelmente, a região genômica onde QTL-11h está

localizado, é posicionada entre marcadores P14M6O-215e e P22M51-174e como mostrado em Figura 4. Portanto, qualquer marcador localizado dentro de tal região pode ser usado para verificar a presença do QTL no genoma de uma planta, assim como qualquer marcador conhecido por ser localizado em tal região baseado em informação publicamente disponível.

Mais confiavelmente, a região genômica onde QTL-12h está localizado, é posicionada entre marcadores P14M61-420h e P22M50-131h como mostrado em Figura 5. Portanto, qualquer marcador localizado dentro de tal região pode ser usado para verificar a presença do QTL no genoma de uma planta, assim como qualquer marcador conhecido por ser localizado em tal região baseado em informação publicamente disponível.

Preferivelmente, um QTL da presente invenção compreende pelo menos um marcador de Tabelas 1 – 5 associado com dito QTL. Pelo fato da seqüência de ácidos nucleicos do QTL que é responsável por conferir a resistência a *Botrytis* poder ser apenas uma fração do QTL inteiro neste lugar identificado, os marcadores indicam meramente herança ligada de regiões genéticas ou a ausência de recombinação observada dentro de tais regiões genéticas. Portanto, é observado que os marcadores listados em Tabelas 1 - 5 indicam a região cromossômica onde um QTL da invenção está localizado no genoma das linhagens de *Solanum* especificadas e que estes marcadores não necessariamente definem os limites ou a estrutura de tal QTL. Assim, a parte do QTL que compreende a(s) seqüência(s) de ácidos nucleicos conferindo resistência essencial(is) pode ser consideravelmente menor do que aquela indicada pelos marcadores contíguos listados para um QTL particular. Uma tal parte é neste lugar referida como uma "parte conferindo resistência" de um QTL. Como um resultado a parte conferindo resistência de um QTL não necessariamente precisa compreender qualquer de ditos marcadores listados. Outros marcadores também podem ser usados para indicar os vários QTLs, contanto que tais marcadores sejam geneticamente ligados aos QTLs e a

pessoa versada pode encontrar ou usar um QTL que é análogo àqueles da presente invenção, mas caracterizado pelo fato de que um ou mais marcadores listados em tabelas 1 – 5 e indicados como sendo ligados a dito QTL estão ausentes.

5                   Uma parte conferindo resistência a *Botrytis* de um QTL para resistência contra *Botrytis* em tomate pode ser identificada usando uma técnica de marcador molecular, por exemplo, com um ou mais dos marcadores para um QTL mostrado em Tabelas 1 - 5 como sendo ligados a dito QTL, preferivelmente em combinação com um bioensaio de resistência.

10 Plantas de tomate que não compreendem uma parte conferindo resistência a *Botrytis* de um QTL da presente invenção são relativamente susceptíveis a infecção por *Botrytis*.

Os marcadores fornecidos pela presente invenção muito adequadamente podem ser usados para detectar a presença de um ou mais

15 QTLs da invenção em uma planta de tomate resistente a *Botrytis* suspeita, e, portanto podem ser usados em métodos envolvendo melhoramento auxiliado por marcador e seleção de plantas de tomate resistentes a *Botrytis*. Preferivelmente, detectar a presença de um QTL da invenção é realizado com pelo menos um dos marcadores para um QTL mostrado em Tabelas 1 - 5

20 como sendo ligados a dito QTL. A presente invenção, portanto se refere em outro aspecto a um método para detectar a presença de um QTL para resistência a *Botrytis*, compreendendo detectar a presença de uma seqüência de ácidos nucleicos de dito QTL em uma planta de tomate resistente a *Botrytis* suspeita, cuja presença pode ser detectada pelo uso dos ditos

25 marcadores.

A seqüência de ácidos nucleicos de um QTL da presente invenção pode ser determinada por métodos conhecidos pela pessoa versada. Por exemplo, uma seqüência de ácidos nucleicos compreendendo dito QTL ou uma parte conferindo resistência do mesmo pode ser isolada de uma planta

doadora resistente a *Botrytis* fragmentando o genoma de dita planta e selecionando aqueles fragmentos abrigando um ou mais marcadores indicativos de dito QTL. Subseqüentemente, ou alternativamente, as seqüências marcadoras (ou partes da mesma) indicativas de dito QTL podem ser usadas como iniciadores de amplificação (PCR), a fim de amplificar uma seqüência de ácidos nucleicos compreendendo dito QTL a partir de uma amostra de ácido nucleico genômico ou um fragmento de genoma obtido a partir de dita planta. A seqüência amplificada pode ser então purificada a fim de obter o QTL isolado. A seqüência de nucleotídeos do QTL, e/ou de quaisquer marcadores adicionais compreendidos neste, pode ser então obtida por métodos de seqüenciamento padrão.

A presente invenção, portanto também se refere a uma seqüência isolada de ácido nucleico (preferivelmente DNA) que compreende um QTL da presente invenção, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo. Assim, os marcadores que detalham exatamente os vários QTLs descritos neste lugar podem ser usados para a identificação, isolamento e purificação de um ou mais genes de tomate que codificam para resistência a *Botrytis*.

A seqüência de nucleotídeos de um QTL da presente invenção pode, por exemplo, também ser resolvida determinando a seqüência de nucleotídeos de um ou mais marcadores associados com dito QTL e construindo iniciadores internos para ditas seqüências marcadoras que podem ser então usadas para determinar posteriormente a seqüência do QTL fora de ditas seqüências marcadoras. Por exemplo, a seqüência de nucleotídeos dos marcadores AFLP de Tabelas 1 - 5 pode ser obtida isolando ditos marcadores do gel de eletroforese usado na determinação da presença de ditos marcadores no genoma de uma planta sujeito, e determinando a seqüência de nucleotídeos de ditos marcadores por exemplo por métodos dideoxi de terminação de cadeia, bem conhecidos na arte.

Em formas de realização de tais métodos para detectar a presença de um QTL em uma planta de tomate resistente a *Botrytis* suspeita, o método também pode compreender as etapas de fornecer um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo capaz de hibridizar em condições estringentes de hibridização com uma seqüência de ácidos nucleicos de um marcador ligado a dito QTL, preferivelmente selecionado a partir dos marcadores de Tabelas 1 - 5 como sendo ligado a dito QTL, colocar em contato dito oligonucleotídeo ou polinucleotídeo com um ácido nucleico genômico de uma planta de tomate resistente a *Botrytis* suspeita, e determinar a presença de hibridização específica de dito oligonucleotídeo ou polinucleotídeo com dito ácido nucleico genômico. Preferivelmente dito método é realizado em uma amostra de ácido nucleico obtida de dita planta de tomate resistente a *Botrytis* suspeita, embora métodos de hibridização in situ também possam ser empregados. Alternativamente, e em uma forma de realização mais preferida, a pessoa versada pode, uma vez que a seqüência de nucleotídeos do QTL foi determinada, construir sondas de hibridização específicas ou oligonucleotídeos capazes de hibridizar em condições estringentes de hibridização com a seqüência de ácidos nucleicos de dito QTL e pode usar tais sondas de hibridização em métodos para detectar a presença de um QTL da invenção em uma planta de tomate resistente a *Botrytis* suspeita.

A frase "condições estringentes de hibridização" se refere a condições nas quais uma sonda ou polinucleotídeo irá hibridizar com sua subsequência alvo, tipicamente em uma mistura complexa de ácidos nucleicos, mas essencialmente com nenhuma outra seqüência. Condições estringentes são dependentes de seqüência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. Seqüências maiores hibridizam especificamente em temperaturas mais altas. Um guia extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen (Thijssen, 1993). Geralmente, condições estringentes são selecionadas para ser cerca de 5-10°C menor do que o ponto

de fusão térmica ( $T_m$ ) para a seqüência específica em um pH de força iônica definido. A  $T_m$  é a temperatura (em força iônica, pH, e concentração de ácido nucleico definidos) na qual 50% das sondas complementares ao alvo hibridizam com a seqüência alvo em equilíbrio (pois as seqüências alvo estão presentes em excesso, em  $T_m$ , 50% das sondas estão ocupadas em equilíbrio). Condições estringentes serão aquelas nas quais a concentração salina é menor do que cerca de 1,0 M de íon de sódio, tipicamente cerca de 0,01 a 1,0 M de concentração de íon de sódio (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é pelo menos cerca de 30°C para sondas pequenas (e.g., 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para sondas grandes (e.g., maiores do que 50 nucleotídeos). Condições estringentes também podem ser atingidas com a adição de agentes desestabilizantes tal como formamida. Para hibridização seletiva ou específica, um sinal positivo é pelo menos duas vezes o histórico, preferivelmente 10 vezes hibridização antecedente. Condições estringentes de hibridização exemplares são freqüentemente: 50% formamida, SxSSC, e 1% SDS, incubando em 42°C, ou, 5xSSC, 1% SDS, incubando em 65°C, com lavagem em 0,2xSSC, e 0,1% SDS a 65°C. Para PCR, uma temperatura de cerca de 36°C é típica para amplificação de baixa estringência, embora temperaturas de anelamento possam variar entre cerca de 32°C e 48°C dependendo de comprimento de iniciador. Orientações adicionais para determinar parâmetros de hibridização são fornecidas em numerosas referências, e.g. Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel, et al. 1995).

"Ácido nucleico" ou "oligonucleotídeo" ou "polinucleotídeo" ou equivalentes gramaticais usados neste lugar significam pelo menos dois nucleotídeos covalentemente ligados. Oligonucleotídeos tipicamente são de cerca de 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 20 25, 30, 40, 50 ou até cerca de 100 nucleotídeos de comprimento. Ácidos nucleicos e polinucleotídeos são polímeros de qualquer comprimento, incluindo comprimentos maiores, e.g.,

200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Um ácido nucleico da presente invenção geralmente irá conter ligações de fosfodiéster, embora em alguns casos, estejam incluídos análogos de ácidos nucleicos que podem ter esqueletos alternados, compreendendo, e.g., ligações de fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, ou O-metilfororoamidita (veja Eckstein, 1991), e esqueletos e ligações de ácido nucleico peptídico. Misturas de ácidos nucleicos naturalmente ocorrentes e análogos podem ser usadas. Análogos particularmente preferidos para oligonucleotídeos são ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

#### 10 Produção de plantas de tomate resistentes a *Botrytis* por métodos transgênicos

De acordo com outro aspecto da presente invenção, uma seqüência de ácidos nucleicos (preferivelmente DNA) compreendendo pelo menos um QTL da presente invenção ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, pode ser usada para a produção de uma planta de tomate resistente a *Botrytis*. Neste aspecto, a invenção sustenta o uso de um QTL para a presente invenção ou partes conferindo resistência a *Botrytis* do mesmos, para produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, cujo uso envolve a introdução de uma seqüência de ácidos nucleicos compreendendo dito QTL em uma planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis*. Como determinado, dita seqüência de ácidos nucleicos pode ser derivada de uma planta de tomate doadora resistente a *Botrytis* adequada. Duas plantas de tomate doadoras resistentes a *Botrytis* adequadas capazes de fornecer uma seqüência de ácidos nucleicos compreendendo pelo menos um dos QTLs descritos acima, ou partes conferindo resistência a *Botrytis* do mesmos, são *S. habrochaites* LYC 4/78. Outras plantas de tomate relacionadas que exibem resistência a *Botrytis* e compreendem um ou mais genes que codificam para resistência a *Botrytis* também podem ser utilizadas como plantas doadoras de resistência a *Botrytis*, pois a presente invenção descreve como este material pode ser identificado. Outros acessos de espécies de tomate podem ser

examinados para resistência a *Botrytis* incluindo, mas não limitado a, *Lycopersicon cerasiforme*, *Lycopersicon cheesmanii*, *Lycopersicon chilense*, *Lycopersicon chmielewskii*, *Solanum lycopersicum*, *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon parviflorum*, *Lycopersicon pennellii*, *Lycopersicon peruvianum*,  
5 *Lycopersicon pimpinellifolium* e *Solanum lycopersicoides*.

Uma vez identificada em uma planta de tomate doadora adequada, a seqüência de ácidos nucleicos que compreende um QTL para resistência a *Botrytis* de acordo com a presente invenção, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, pode ser transferida para uma  
10 planta receptora adequada por qualquer método disponível. Por exemplo, a dita seqüência de ácidos nucleicos pode ser transferida cruzando uma planta de tomate doadora de resistência a *Botrytis* com uma planta de tomate receptora susceptível (i.e. por introgressão), por transformação, por fusão de protoplastos, por uma técnica de haplóide duplicado ou por resgate de  
15 embriões ou por qualquer outro sistema de transferência de ácido nucleico, opcionalmente seguido por seleção de plantas descendentes compreendendo o QTL e exibindo resistência a *Botrytis*. Para métodos transgênicos de transferência uma seqüência de ácidos nucleicos compreendendo um QTL para resistência a *Botrytis* de acordo com a presente invenção, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, pode ser isolada de dita planta  
20 doadora usando métodos conhecidos na arte e a seqüência de ácidos nucleicos assim isolada pode ser transferida para a planta receptora por métodos transgênicos, por exemplo, por meio de um vetor, em um gameta, ou em qualquer outro elemento de transferência adequado, tal como uma partícula  
25 balística revestida com dita seqüência de ácidos nucleicos.

Transformação vegetal geralmente envolve a construção de um vetor de expressão que irá funcionar em células vegetais. Na presente invenção, um tal vetor compreende uma seqüência de ácidos nucleicos que compreende um QTL para resistência a *Botrytis* da presente invenção, ou uma

parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, cujo vetor pode compreender um gene conferindo resistência a *Botrytis* que está sob controle de ou operacionalmente ligado a um elemento regulador, tal como um promotor. O vetor de expressão pode conter uma ou mais tais combinações de gene operacionalmente ligado/elemento regulador, contanto que pelo menos um dos genes contidos nas combinações codifique para resistência a *Botrytis*. O(s) vetor(es) pode(m) estar na forma de um plasmídeo, e pode(m) ser usado(s), sozinho(s) ou em combinação com outros plasmídeos, para fornecer plantas transgênicas que são resistentes a *Botrytis*, usando métodos de transformação conhecidos na arte, tal como o sistema de transformação por *Agrobacterium*.

Vetores de expressão podem incluir pelo menos um gene marcador, operacionalmente ligado a um elemento regulador (tal como um promotor) que permite que células transformadas contendo o marcador sejam recuperadas ou por seleção negativa (inibindo o crescimento de células que não contêm o gene marcador selecionável), ou por seleção positiva (monitorando o produto codificado pelo gene marcador). Genes marcadores selecionáveis muito comumente usados para transformação vegetal são conhecidos na arte, e incluem, por exemplo, genes que codificam para enzimas que detoxificam metabolicamente um agente químico seletivo que pode ser um antibiótico ou um herbicida, ou genes que codificam um alvo alterado que é insensível ao inibidor. Diversos métodos de seleção positiva são conhecidos na arte, tal como seleção da manose. Alternativamente, transformação sem marcador pode ser usada para obter plantas sem genes marcadores mencionados, as técnicas para tal são conhecidas na arte.

Um método para introduzir um vetor de expressão em uma planta é baseado no sistema de transformação natural de *Agrobacterium* (veja e.g. Morsch et al., 1985). *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias de solo patogênicas para plantas que transformam geneticamente células vegetais. Os

plasmídeos Ti e Ri de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, respectivamente, carregam genes responsáveis por transformação genética da planta (veja e.g. Kado, 1991). Métodos de introduzir vetores de expressão em tecido vegetal incluem a infecção direta ou co-cultivo de células vegetais com *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch et al., 1985). Descrições de sistemas de vetores de *Agrobacterium* e métodos para transferência gênica mediada por *Agrobacterium* fornecidas por Gruber e Crosby, 1993 e Moloney et al., 1989. Veja também, Patente Norte-Americana No. 5.591.616. Descrições gerais de vetores de expressão vegetais e genes repórteres e protocolos de transformação e descrições de sistemas de vetores de *Agrobacterium* e métodos para transferência gênica mediada por *Agrobacterium* podem ser encontrados em Gruber e Crosby, 1993. Métodos gerais de cultivar tecidos vegetais são fornecidos, por exemplo, por Miki et al., 1993 e por Phillips, et al., 1988. Um manual de referência apropriado para técnicas de clonagem molecular e vetores de expressão adequados é Sambrook e Russell (2001).

Outro método para introduzir um vetor de expressão em uma planta é baseado em transformação por microprojétil caracterizada pelo fato de que DNA é carregado na superfície de microprojéteis. O vetor de expressão é introduzido em tecidos vegetais com um dispositivo de biolística que acelera os microprojéteis para velocidades de 300 a 600 m/s o que é suficiente para penetrar paredes e membranas de célula vegetal (Veja, Sanford et al., 1987, 1993; Sanford, 1988, 1990; Klein et al., 1988, 1992). Outro método para introduzir DNA em plantas é através da sonicação de células alvo (veja Zhang et al., 1991). Alternativamente, fusão de lipossomo ou esferoplasto foi usada para introduzir vetores de expressão em plantas (veja e.g. Deshayes et al., 1985 e Christou et al., 1987). Absorção direta de DNA em protoplastos usando precipitação de  $\text{CaCl}_2$ , álcool polivinílico ou poli-Lornitina também foi relatada (veja e.g., Hain et al. 1985 e Draper et al., 1982). Eletroporação de protoplastos e células inteiras e tecidos também

foram descritas (D'Halluin et al., 1992 e Laursen et al., 1994).

Seguindo transformação de tecidos alvo de tomate, expressão dos genes marcadores selecionáveis descritos acima permite seleção preferencial de células, tecidos e/ou plantas transformadas, usando métodos de regeneração e seleção atualmente bem conhecidos na arte. Os marcadores de Tabelas 1 - 5 também podem ser usados para tal propósito.

#### Produção de plantas de tomate resistentes a *Botrytis* por métodos não transgênicos

Em uma forma de realização alternativa para produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, fusão de protoplasto pode ser usada para a transferência de ácidos nucleicos de uma planta doadora para uma planta receptora. Fusão de protoplasto é uma união induzida ou espontânea, tal como uma hibridização somática, entre dois ou mais protoplastos (células das quais as paredes celulares são removidas por tratamento enzimático) para produzir uma célula uni, bi ou multinucleada. A célula fusionada, que pode ainda ser obtida com espécies vegetais que não podem ser intercruzadas na natureza, é cultivada em tecido em uma planta híbrida exibindo a combinação desejável de características. Mais especificamente, um primeiro protoplasto pode ser obtido de uma planta de tomate ou outra linhagem de planta que exibe resistência a infecção por *Botrytis*. Por exemplo, um protoplasto de *S. habrochaites* LYC 4/78 pode ser usado. Um segundo protoplasto pode ser obtido de um segundo tomate ou outra variedade vegetal, preferivelmente uma linhagem de tomate que compreende características desejáveis comercialmente, tal como, mas não limitado a características de resistência a doença, resistência a inseto, fruto valioso, etc. Os protoplastos são então fusionados usando procedimentos tradicionais de fusão de protoplasto, que são conhecidos na arte.

Alternativamente, resgate de embriões pode ser empregado na transferência de um ácido nucleico compreendendo um ou mais QTLs da

presente invenção de uma planta doadora para uma planta receptora. Resgate de embriões pode ser usado como um procedimento para isolar embriões de cruzamentos caracterizados pelo fato de que plantas falham em produzir sementes viáveis. Neste processo, o ovário fertilizado ou sementes imaturas de uma planta é cultivado em tecido para criar novas plantas (Pierik, 1999).

A presente invenção também se refere a um método de produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis* compreendendo as etapas de realizar um método para detectar a presença de um locus de característica quantitativa (QTL) associado com resistência a *B. cinerea* em uma planta de tomate doadora de acordo com invenção como descrito acima, e transferir uma seqüência de ácidos nucleicos compreendendo pelo menos um QTL assim detectado, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, de dita planta doadora para uma planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis*. A transferência de dita seqüência de ácidos nucleicos pode ser realizada por qualquer dos métodos previamente descritos neste lugar.

Uma forma de realização preferida de um tal método compreende a transferência por introgressão de dita seqüência de ácidos nucleicos de uma planta de tomate doadora resistente a *Botrytis* para uma planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis* cruzando ditas plantas. Esta transferência pode ser assim adequadamente realizada usando técnicas tradicionais de melhoramento. QTLs são preferivelmente introgrididos em variedades comerciais de tomate usando melhoramento auxiliado por marcador (MAS). Melhoramento auxiliado por marcador ou seleção auxiliada por marcador envolve o uso de um ou mais dos marcadores moleculares para a identificação e seleção daquelas plantas descendentes que contêm um ou mais dos genes que codificam para a característica desejada. No presente exemplo, tal identificação e seleção são baseadas em seleção de QTLs da presente invenção ou marcadores associados com estes. MAS também pode ser usado para desenvolver linhagens quase isogênicas (NIL) abrigando o

QTL de interesse, permitindo um estudo mais detalhado de cada efeito de QTL e também é um método efetivo para desenvolvimento de populações de linhagem congênita de retrocruzamento (BIL) (veja e.g. Nesbitt et al., 2001; van Berloo et al., 2001). Plantas de tomate desenvolvidas de acordo com esta  
5 forma de realização preferida vantajosamente podem derivar uma maioria de suas características da planta receptora, e derivar resistência a *Botrytis* da planta doadora.

Uma vez que resistência a *B cinerea* é herdada poligenicamente, é preferido que pelo menos dois, preferivelmente três QTLs  
10 ou partes conferindo resistência a *Botrytis* do mesmos, sejam inseridos por um método de transferência adequado em uma única planta receptora, i.e. que múltiplos QTLs sejam sobrepostos no genoma da planta receptora. Acredita-se que sobreposição de dois ou mais QTLs da invenção pode levar a uma resistência aumentada a *Botrytis*. Como a pessoa versada irá prontamente  
15 entender, sobreposição pode ser atingida por qualquer método, por exemplo, transformando uma planta com uma construção de ácido nucleico compreendendo múltiplos QTLs da invenção. Alternativamente, pelo menos um QTL pode estar presente em cada planta parental de um cruzamento, de forma que pelo menos dois QTLs são compreendidos no híbrido resultante.  
20 Plantas altamente resistentes podem ser obtidas por sobreposição das mesmas características de resistência. Tais plantas são formas de realização altamente preferidas da presente invenção.

Como discutido brevemente acima, técnicas tradicionais de melhoramento podem ser usadas para introgridir uma seqüência de ácidos  
25 nucleicos codificando para resistência a *Botrytis* em uma planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis*. Em um método, que é referido como melhoramento genético genealógico, uma planta de tomate doadora que exhibe resistência a *Botrytis* e compreendendo uma seqüência de ácidos nucleicos codificando para resistência a *Botrytis* é cruzada com uma planta de tomate

receptora susceptível a *Botrytis* que preferivelmente exibe características desejáveis comercialmente, tal como, mas não limitado a, características de resistência a doença, resistência a inseto, fruto valioso, etc. A população vegetal resultante (representando os híbridos FI) é então autopolinizada e sementes estabelecidas (sementes F2). As plantas F2 cultivadas a partir das sementes F2 são então monitoradas para resistência a *Botrytis*. A população pode ser monitorada de diversas maneiras diferentes.

Primeiro, a população pode ser monitorada usando um monitoramento tradicional de doença. Tais monitoramentos de doença são conhecidos na arte. Preferivelmente um bioensaio quantitativo de infecção de caule ou folha é usado, preferivelmente o bioensaio de caule usado em métodos da presente invenção como descrito em mais detalhe acima e nos Exemplos é usado. Segundo, seleção auxiliada por marcador pode ser realizada usando um ou mais dos marcadores moleculares descritos acima para identificar aquela progênie que compreende uma seqüência de ácidos nucleicos codificando para resistência a *Botrytis*. Outros métodos, referidos acima por métodos para detectar a presença de um QTL podem ser usados. Também, seleção auxiliada por marcador pode ser usada para confirmar os resultados obtidos a partir dos bioensaios quantitativos, e, portanto, diversos métodos também podem ser usados em combinação.

#### Plantas e sementes de tomate resistentes a *Botrytis*

Uma planta de tomate resistente a *Botrytis* da presente invenção é caracterizada por ter um alto nível de resistência. Isto é definido como sendo um nível de resistência que é maior do que aquele observado para plantas de controle susceptíveis. De fato, as plantas da invenção têm um nível de resistência que é maior do que aquele de qualquer variedade comercial de tomate, i.e. uma variedade tendo características desejáveis comercialmente, conhecida até o momento. Uma planta da invenção tem uma susceptibilidade a *Botrytis cinerea* que é pelo menos 3 vezes menor do que uma planta de

controle susceptível quando medida por um bioensaio. Por exemplo, quando medida por um bioensaio caracterizado pelo fato de que o comprimento médio de uma lesão de caule resultando de infecção por *Botrytis cinerea* em plantas adultas é medido durante um período de três semanas em condições de prática padrão como descrito em mais detalhe nos Exemplos 3.10 e 3.11. Tipicamente, uma planta da invenção tem um nível de resistência que resulta em um comprimento médio de lesão de caule de lesões de *Botrytis cinerea* em plantas adultas de menos do que 3,2 cm três semanas depois de inoculação usando condições de prática padrão em um bioensaio de resistência concebido para determinar resistência baseada em tais características. Mais tipicamente, uma planta da invenção mostra um comprimento médio de lesão de caule de menos do que 2,9 cm. Algumas plantas da invenção ainda mostram um comprimento médio de lesão de caule de 2,0 cm. Levando em conta que ditos números expressam o comprimento de uma lesão incluindo a ferida de inoculação inicial de 2 cm, pode ser inferido que um alto nível de resistência, e mesmo resistência completa no caso de alguns QTLs, é observado em plantas da invenção. Em comparação, plantas de controle susceptíveis mostram um médio comprimento de lesão de caule médio nas mesmas condições de cerca de 3,6 cm a cerca de 6,0 cm, com uma média de 4,85 cm (veja Tabela 7). Também como uma comparação, *S. habrochaites* LA 1777, o QTL-10 contendo fonte parcialmente resistente a Botrytis de Patente Internacional 02/085105, mostra um comprimento de lesão de caule médio nas mesmas condições de cerca de 4,3 cm. Em resumo, as plantas da invenção mostram lesões de caule absolutas no bioensaio de resistência referido acima que são geralmente menores do que cerca de 30% ( $0,9/2,85 \times 100\%$ ) do comprimento absoluto de plantas de controle susceptíveis, e geralmente menores do que cerca de 40% ( $0,9/2,3 \times 100\%$ ) do comprimento absoluto de *S. habrochaites* LA 1777 parcialmente resistente.

Assim, uma planta da presente invenção tem uma

susceptibilidade a *Botrytis cinerea* quando medida por um bioensaio que é 3 vezes menor do que, ou que é menos do que 1/3 o nível de, uma planta de controle susceptível. Reciprocamente, uma planta da invenção é mais do que 3 vezes mais resistente do que uma planta de controle susceptível, como definido neste lugar e determinado com o bioensaio como descrito. Com QTL-lh resistência completa é observada. Uma planta de controle susceptível é definida como uma planta mostrando susceptibilidade normal, ou nenhuma resistência, a infecção por *Botrytis cinerea*. Um exemplo de uma planta de controle susceptível é planta do híbrido *Solanum lycopersicum* cv. "Moneyberg" (De Ruiters Seeds R&D BV, Bergschenhoek, The Netherlands).

Uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, ou uma parte da mesma, viável por um método da invenção também é um aspecto da presente invenção.

Outro aspecto da presente invenção se refere a uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, ou uma parte da mesma, compreendendo dentro de seu genoma pelo menos um QTL, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, selecionado a partir do grupo consistindo dos QTLs em cromossomas 4, 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites* LYC 4/78 associado com resistência a *Botrytis*, caracterizado pelo fato de que dito QTL ou dita parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo não está em seu ambiente genético natural. As plantas de tomate resistentes a *Botrytis* da presente invenção podem ser de qualquer tipo genético tal como natural, híbrida, haplóide, diplóide, partenocarpo ou transgênica. Ademais, as plantas da presente invenção podem ser heterozigotas ou homozigotas para a característica de resistência, preferivelmente homozigotas. Embora os QTLs da presente invenção, assim como aqueles QTLs viáveis por um método da invenção, assim como partes conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo possam ser transferidos para qualquer planta a fim de sustentar uma planta resistente a *Botrytis*, os métodos e plantas da invenção preferivelmente são

relacionados a plantas da família *Solanaceae*, mais preferivelmente tomate.

Em adição aos QTLs em cromossomas 4 (QTL-4hB), 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites* LYC 4/78 associado com resistência a *Botrytis* como identificado neste lugar, uma planta da presente invenção pode  
5 opcionalmente compreender adicionalmente um ou mais QTLs derivados de *S. habrochaites* neste lugar como QTL-1h, QTL-2h e QTL-4hA e descritos em maior detalhe em pedidos co-pendentes PCT/NL2005/000762 e EP 1 652 930 A (Pedido de Patente Européia 04077931.6), aos quais referência explícita é feita neste contexto.

10 É sugerido que uma combinação de QTLs, ou os QTLs como descritos neste lugar ou os QTLs como descritos em PCT/NL2005/000762, iria aumentar a resistência a doença em plantas abrigando uma tal combinação. Entretanto, cada um dos QTLs também carrega informação genética do ancestral passado *S. habrochaites*, o que significa que em  
15 descendência com muita informação genética deste antecedente, não será possível obter plantas com as características agronômicas ótimas desejadas.

Linhagens congênicas de planta de tomate resistente a *Botrytis* podem ser desenvolvidas usando as técnicas de seleção recorrente e retrocruzamento, autopolinização e/ou diplóides ou qualquer outra técnica  
20 usada para fazer linhagens parentais. Em um método de seleção e retrocruzamento, resistência a *Botrytis* pode ser introgridida em uma planta receptora alvo (que é chamada o genitor recorrente) cruzando o genitor recorrente com uma primeira planta doadora (que é diferente do genitor recorrente e referida neste lugar como o "genitor não recorrente"). O genitor  
25 recorrente é uma planta que não é resistente ou tem um baixo nível de resistência a *Botrytis* e possui características desejáveis comercialmente, tal como, mas não limitado a características de resistência a doença, resistência a inseto, fruto valioso, etc. O genitor não recorrente exhibe resistência a *Botrytis* e compreende uma seqüência de ácidos nucleicos que codifica para resistência a

*Botrytis*. O genitor não recorrente pode ser qualquer variedade vegetal ou linhagem congênita que tem fecundação cruzada com o genitor recorrente. A progênie resultante de um cruzamento entre o genitor recorrente e genitor não recorrente são retrocruzadas com o genitor recorrente. A população vegetal resultante é então monitorada. A população pode ser monitorada de diversas maneiras diferentes. Por exemplo, a população pode ser monitorada usando um bioensaio quantitativo de caule como descrito previamente neste lugar. Plantas híbridas F1 que exibem um fenótipo resistente a *Botrytis* compreendem a seqüência de ácidos nucleicos requisitada codificando para resistência a *Botrytis*, e possuem características desejáveis comercialmente, são então selecionadas e autopolinizadas e selecionadas por diversas gerações a fim de permitir que a planta de tomate se torne crescentemente natural. Este processo de autopolinização e seleção continuadas pode ser realizado por duas a cinco ou mais gerações. O resultado de tal melhoramento e seleção é a produção de linhagens que são geneticamente homogêneas para os genes associados com resistência a *Botrytis* assim como outros genes associados com características de interesse comercial. Ao invés de usar monitoramentos de patologia fenotípica de bioensaios, MAS pode ser realizado usando um ou mais dos marcadores moleculares descritos acima, sondas de hibridização ou polinucleotídeos para identificar aquela progênie que compreende uma seqüência de ácidos nucleicos codificando para resistência a *Botrytis*. Alternativamente, MAS pode ser usado para confirmar os resultados obtidos a partir dos bioensaios quantitativos. Uma vez que as seleções apropriadas são feitas, o processo é repetido. O processo de retrocruzamento com o genitor recorrente e selecionar para resistência a *Botrytis* é repetido por aproximadamente cinco ou mais gerações. A progênie resultante deste processo é heterozigota para um ou mais genes que codificam para resistência a *Botrytis*. A última geração de retrocruzamento então autopolinizada a fim de sustentar progênie de melhoramento homozigota pura para resistência a *Botrytis*.

As linhagens congênicas de tomate resistentes a *Botrytis* descritas neste lugar podem ser usadas em cruzamentos adicionais para criar plantas híbridas resistentes a *Botrytis*. Por exemplo, uma primeira planta de tomate congênica resistente a *Botrytis* da invenção pode ser cruzada com uma  
5 segunda planta de tomate congênica possuindo características desejáveis comercialmente tal como, mas não limitado a, características de resistência a doença, resistência a inseto, fruto desejável, etc. Esta segunda linhagem de tomate congênica pode ou não ser resistente a *Botrytis*.

Outro aspecto da presente invenção se refere a um método de  
10 produzir sementes que podem ser cultivadas em plantas de tomate resistentes a *Botrytis*. Em uma forma de realização, o método compreende as etapas de fornecer uma planta de tomate resistente a *Botrytis* da invenção, cruzar dita planta resistente a *Botrytis* com uma planta de *Solanum lycopersicum*, e coletar sementes resultantes de dito cruzamento, as quais quando plantadas,  
15 produzem plantas de tomate resistentes a *Botrytis*.

Em outra forma de realização, o método compreende as etapas de fornecer uma planta de tomate resistente a *Botrytis* da invenção, cruzar dita planta resistente a *Botrytis* com uma planta de *Solanum lycopersicum*, coletar sementes resultantes de dito cruzamento, regenerar ditas sementes em plantas, selecionar  
20 plantas resistentes a *Botrytis* por qualquer dos métodos descritos neste lugar, autopolinizar as plantas selecionadas por um número suficiente de gerações para obter plantas que são fixadas por um alelo que confere resistência a *Botrytis* nas plantas, retrocruzando as plantas assim produzidas com plantas de *S. lycopersicum* tendo características fenotípicas desejáveis por um número suficiente de gerações  
25 para obter plantas de *S. lycopersicum* que são resistentes a *Botrytis* e têm características fenotípicas desejáveis, e coletar as sementes produzidas a partir das plantas resultando do último retrocruzamento, as quais quando plantadas, produzem plantas de tomate que são resistentes a *Botrytis*.

Como forma de exemplo, e não de limitação, Exemplos da

presente invenção serão agora dados.

## EXEMPLOS

### Exemplo 1. Método de identificar QTLs associado com resistência a *Botrytis cinerea*.

#### 5 1.1. Introdução.

Este Exemplo apresenta o desenvolvimento de um bioensaio quantitativo para avaliar a resistência a *Botrytis cinerea* de uma coleção de genótipos selvagens de tomate.

10 Resistência parcial contra *Botrytis cinerea* foi relatada em espécies selvagens de tomate, mas estes relatos foram amplamente descritivos e qualitativos. A identificação de genótipos parcialmente resistentes iria fornecer perspectivas de introgridir resistência em linhagens comerciais para obter linhagens com níveis administráveis de resistência. A disponibilidade de um ensaio reprodutível, objetivo e quantitativo, assim como a identificação de  
15 genótipos com uma resistência a mofo-cinzeno geneticamente determinada (parcial) abre o caminho para melhoramento de resistência em variedades cultivadas de tomate.

O presente Exemplo descreve um ensaio quantitativo de doença. O ensaio é aplicado em folhas (ensaio de inoculação de folha) e segmentos de  
20 caule (ensaio de inoculação de caule). Dois parâmetros para susceptibilidade a doença foram avaliados. O primeiro parâmetro medido foi a incidência de doença (DI), i.e. a proporção de inoculação que resultou em uma lesão em expansão. Se o fracasso (parcial) de uma lesão primária de *B. cinerea* em se expandir em um genótipo hospedeiro particular é uma característica genética da planta, uma tal  
25 característica é importante, pois ela limita diretamente o número de focos de doença na cultura. O segundo parâmetro testado foi a taxa de crescimento de lesão por um período de 24 h (crescimento de lesão, LG). Lesões que se expandiram a partir da mancha de inoculação primária pareceram se espalhar em uma taxa uniforme (em mm/dia) até o momento em que lesão atingiu a beirada da folha ou

o fundo do segmento de caule. Os presentes ensaios possibilitam a quantificação tanto da ocorrência (incidência de doença) como desenvolvimento (crescimento de lesão) de infecção por *B. cinerea*, resultando em dois conjuntos de dados de características quantitativas. O ensaio foi usado para monitorar uma coleção de espécies de tomate (daqui por diante também chamados "acessos") para a presença de resistência nestas.

### 1.2. Plantas

Genótipos vegetais testados são listados em Tabela 6

**Tabela 6:** Lista de genótipos de *Solanum* testados

Código	Fonte <sup>(1)</sup>	Espécie	Especificação/ Cultivar	Folha <sup>(2)</sup>	Caule <sup>(2)</sup>	Referência <sup>(3)</sup>
78/1604	DRS	<i>S. lycopersicum</i>	Kecksemeti Torpe	Y	Y	
82/2577	DRS	<i>S. lycopersicum</i>	Futura	Y	Y	
83/2896	DRS	<i>S. lycopersicum</i>	Biruınca	Y		
89/3695	DRS	<i>S. lycopersicum</i>	X <i>S. lycopersicum</i> var. cerasiforme		Y	
89/3793	DRS	<i>S. pimpinellifolium</i>			Y	
89/3862	DRS	<i>S. lycopersicum</i>	Olomoucke	Y		
90/4063	DRS	<i>S. lycopersicum</i>	L 4034	Y		
91/4311	DRS	<i>S. lycopersicum</i>	Seedathip 2	Y	Y	
96/4326	DRS	<i>S. lycopersicoides</i>	Gb nr 90124	Y	Y	
MM	WU PPW	<i>S. lycopersicum</i>	Moneymaker	S	S	
G1.1290	WU LoPB	<i>S. habrochaites</i>			Y	
G1.1556	WU LoPB	<i>S. chilense</i>		Y	Y	
G1.1558	WU LoPB	<i>S. chilense</i>		Y		
G1.1560	WU LoPB	<i>S. habrochaites</i>		Y	Y	
G1.1601	WU LoPB	<i>S. neorickii</i>		Y	Y	
G1.1615	WU LoPB	<i>S. cheesmanii</i>			Y	
IZ.2 <sup>(3)</sup>	MPIZK	<i>S. pimpinellifolium</i>			Y	(Urbasch, 1986)
LA.716	TGRC	<i>S. pennellii</i>		Y		
LA.2157	TGRC	<i>L. peruvianum</i>			Y	
LA.2172	TGRC	<i>L. peruvianum</i>			Y	
Lyc. 4/78 <sup>(3)</sup>	IPK	<i>S. habrochaites</i>		Y	Y	(Urbasch, 1986)
T160/79 <sup>(3)</sup>	IPK	<i>L. glandulosum</i>			Y	(Urbasch, 1986)
T566/81 <sup>(3)</sup>	IPK	<i>S. habrochaites</i>			Y	(Urbasch, 1986)

10 **1 DRS:** De Ruiter Seeds, Bergschenhoek, The Netherlands; WU PPW: Plantkundig Proefcentrum Wageningen, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands; LoPB: Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands; MPIZK: Max Planck Institut für Züchtungsforschung an Kulturpflanze, Köln, Alemanha; TGRC: Tomato Genetics Resource Center, University of California at Davis, Davis CA, USA; IPK: Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Alemanha.

15 **2 Y** indica que o genótipo foi testado no ensaio particular, **S** indica que o genótipo serviu como um controle de referência susceptível.

**(3)** Publicado antes como sendo resistente contra *B. cinerea*.

Plantas foram cultivadas em solo de vaso em potes de 12 cm em uma casa de vegetação com temperatura mínima de 15°C. Luz artificial de sódio foi aplicada (16 h/dia) de Outubro até Março. Em 5-7 dias depois de germinação, 10 ml de solução de FeNaEDTA (3,5 g/l) foi adicionado, seguido 5 3 dias depois por 10 ml de solução de micronutrientes (0,286 g/l de H<sub>3</sub>B<sub>3</sub>O<sub>3</sub>; 0,1558 g/l de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,008 g/l de CuO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,022 g/l de ZnSO<sub>4</sub>; 0,00196 de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O). De duas semanas depois de germinação em diante, 5 ml de uma solução Hoagland (5 mM de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 5 mM de KNO<sub>3</sub>; 2 mM de MgSO<sub>4</sub>; 1 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) foram adicionados em uma base 10 semanal.

### 1.3. Ensaio foliar

Um inóculo de *B. cinerea* linhagem B05.10 foi preparado de acordo com Benito (1998). Para cada planta individual uma ou duas folhas compostas que foram completamente desenroladas foram destacadas do caule principal com uma lâmina de barbear afiada e transferidas para espuma de 15 florista pré-umedecida. A espuma de florista foi colocada em uma placa de Petri contendo água de torneira e subseqüentemente colocada em um recipiente umedecido por líquido pulverizável contendo papel filtro úmido. As folhas compostas foram então inoculadas com uma suspensão conidial de 20 *B. cinerea* pipetando cuidadosamente um total de 6 a 10 gotículas de inóculo (2 µl) na superfície superior das folhas. Os recipientes foram fechados com uma tampa umedecida por líquido pulverizável e incubados a 15°C no escuro a 100% RH, essencialmente como descrito por Benito et al., 1998. Adequadamente, uma folha composta foi dividida em quatro folíolos, e 25 caracterizada pelo fato de que cada folíolo foi inoculado com 10 gotas de 2 µl cada, contendo 2000 conídios. Tanto a proporção de lesões agressivas em expansão (incidência de doença) como a taxa de crescimento de lesão foram monitoradas por diversos dias.

Para corrigir variação causada pela estação ou cultivo das

plantas, a incidência de doença de um genótipo particular em cada experimento foi relacionada à incidência de doença de Moneymaker testada naquele mesmo experimento.

Tamanhos de lesões foram medidos em 96, 120 e 144 hpi usando um compasso de calibre. A incidência de doença foi determinada dividindo o número total de lesões em expansão pelo número total de gotículas de inoculação. Taxas de crescimento de lesão foram determinadas calculando o aumento em tamanho de lesão (em mm) por um período de 24 h. Dados para as lesões não em expansão foram deletados da análise quantitativa.

#### *1.4. Ensaio de caule (procedimento padronizado)*

O ensaio de caule foi realizado como segue: Os 5-10 cm de topo e 5-10 cm de fundo do caule de plantas de aproximadamente 50 cm de altura foram removidos e os 30 cm remanescentes foram cortados em segmentos iguais de 5-6 cm. Cada segmento de caule foi colocado virado para cima em um látice com a base de caule em papel filtro úmido. Antes de inoculação, os segmentos de caule foram pulverizados com água de torneira a fim de assegurar uma distribuição igual do inóculo pela superfície da lesão. Inóculo foi preparado como descrito para o ensaio foliar. Uma gota de um inóculo de 5 v1, contendo aproximadamente 106 conídios - ml-1, foi aplicada ao topo de cada segmento de caule. Incubações foram realizadas a 15 & 2 °C no escuro com 100% de umidade relativa. Progresso de infecção foi determinado medindo o avanço máximo de sintoma de decomposição em vários intervalos de tempo depois de inoculação com um compasso de calibre Vernier.

Para cada genótipo, a porcentagem de pedaços infectados do caule foi calculada. A incidência de doença foi determinada dividindo o número total de segmentos de caule com lesões em expansão pelo número total de segmentos inoculados. Taxas de crescimento de lesão foram

determinadas calculando o aumento em tamanho de lesão por um período de 24 h, através do que os dados para as lesões não em expansão foram omitidos da análise.

### 1.5. Resultados

5                   A incidência de doença e crescimento de lesão em experimentos de infecção de folha separada foram determinados por diversos dias para cada genótipo, normalmente de 2-4 dias após infecção. A incidência de doença em *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, que serviu como uma referênci  
10                   a, flutuou entre 15 e 78 % nestes experimentos. Exceto para genótipos 8212577 e 8312896 (ambas as espécies de *S. lycopersicum*), os genótipos testados mostraram em todos os experimentos uma menor incidência de doença do que Moneymaker. Genótipos G1.1556, G1.1560 e G1.1601 mostraram uma baixa incidência de doença em três experimentos independentes, variando de 0 a 21%. Análise estatística indicou que a  
15                   incidência de doença em genótipos 7811604, 9114311, 9614326, G1.1556, G1.1558, G1.1560, G1.1601, LA716 e LYC 4/78 foi significativamente menor do que na linhagem de controle *S. lycopersicum* cv. Moneymaker ( $p < 0,05$ ). Houve, entretanto, uma grande variação entre semanas e algumas das diferenças observadas em ensaios de folha separada podem na realidade não  
20                   serem tão robustas por causa das flutuações em incidência de doença entre experimentos/semanas (15-78%).

                    Dentro destes genótipos resistentes (com uma incidência de doença significativamente menor do que aquela na referênci  
25                   a de Moneymaker), as lesões que se expandiram com sucesso freqüentemente não o fizeram em taxa similar à de Moneymaker (e.g. 9614326, G1.1560, LA716). A situação inversa não foi encontrada: nenhum dos genótipos apresentou uma incidência de doença similar àquela de Moneymaker, mas uma taxa de crescimento de lesão mais lenta do que Moneymaker.

                    Taxa de crescimento de lesão por um período de 24h (entre 48

e 72 hpi) na maioria dos genótipos esteve no mesmo intervalo que MoneyMaker. Cinco acessos (9114311, 160179, G1.1556, G1.1601 e LYC 4178) mostraram uma taxa de crescimento de lesão mais lenta, o que foi estatisticamente significativamente diferente daquela de *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker.

O ensaio de infecção de segmento de caule pareceu ser mais robusto do que o ensaio foliar em termos de reprodutibilidade entre experimentos realizados em diferentes estações. Mesmo embora o número de pontos de dados com segmentos de caule (5-8 segmentos por planta) seja em grande escala menor do que com o ensaio foliar (40 gotículas de inoculação por folha composta, uma ou duas folhas podem ser testadas por planta), a variabilidade entre experimentos foi geralmente menor no ensaio de segmento de caule. A incidência de doença no ensaio de caule para o genótipo de controle *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker variou de 52-95%. A incidência de doença em 17 genótipos foi comparada com a incidência de doença da linhagem de controle *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker determinada no mesmo experimento/semana. A maioria dos genótipos mostrou uma incidência de doença em um intervalo similar à linhagem de controle MoneyMaker. Genótipos G1.1556 (29% e 41%) e G1.1560 (28% e 7%) mostraram uma incidência de doença reduzida. Apenas G1.1560 diferiu estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do controle.

As taxas de crescimento de lesão no ensaio de caule para o genótipo de controle *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker variaram de 5,4 a 9,2 mm/dia. As taxas de crescimento de lesão de muitos genótipos estiveram em um intervalo similar ao controle. Entretanto, em acessos 8913793, G1.1601, LYC 4178, T566-81, a taxa de crescimento de lesão foi estatisticamente significativamente diferente ( $p < 0,01$ ) do controle cv. MoneyMaker.

Com diversos genótipos que foram classificados como parcialmente resistentes no ensaio de segmento de caule, ensaios qualitativos

foram realizados em plantas inteiras, cultivadas em uma estufa para plantas em Rockwool®. O objetivo foi avaliar se genótipos que pareciam resistentes em segmentos de caule em condições de laboratório de fato foram mais resistentes do que linhagens de controle em um sistema de cultivo semi-comercial. Plantas foram cultivadas em ordem aleatorizada em fileiras de Rockwool®, o compartimento de estufa para plantas foi preenchido com frutas cítricas pesadamente infectadas por *B. cinerea* em ponto de esporulação. O compartimento de estufa para plantas foi mantido em alta umidade pulverizando o piso duas vezes a dia com água de torneira e deixando portas e janelas fechadas. Em intervalos regulares ferimentos de desrama foram feitas em todas as plantas e a ocorrência de mofo-cinzento foi monitorada ao longo do tempo.

Diversos acessos de tomate selvagem foram identificados que apresentaram uma severa redução de ambos os parâmetros, assim fornecendo fontes potenciais para introgridir dois mecanismos potencialmente independentes de resistência parcial em *S. lycopersicum*.

**Exemplo 3.** Mapeamento de resistência parcial a *Botrytis cinerea* em uma população interespecífica de tomate (*S. lycopersicum* cv Moneymaker x *S. habrochaites* acesso LYC 4/78)

Neste Exemplo, dois loci QTL conferindo resistência parcial a *B. cinerea* originados de *S. habrochaites* LYC 4/78 são apresentados. Uma confirmação dos resultados foi obtida verificando o nível de resistência a *B. cinerea* em duas populações BCzSi segregando para um dos dois loci QTL respectivamente.

### 3.1. Material vegetal

Sementes de *Solanum habrochaites* LYC 4/78 (daqui por diante referido como LYC 4/78) foram obtidas a partir do banco de genes localizado no Institute for Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Alemanha.

Sementes de *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (daqui por diante referido como Moneymaker) foram obtidas a partir do banco de sementes de De Rooter Seeds R&D BV, Bergschenhoek, The Netherlands.

Um cruzamento interespecífico entre Moneymaker e LYC  
5 **4/78** foi feito para produzir sementes F1. As sementes F1 foram cultivadas em plantas F1. Sementes F2, derivadas a partir de autopolinização de uma planta F1 foram semeadas para obter uma população F2 de **174** indivíduos. Uma população BC2 (retrocruzamento **2**) de **59** indivíduos foi gerada por dois ciclos de retrocruzamento com Moneymaker como o genitor recorrente e  
10 feminino. Usando MAS, BC2, BC3, e BC4 foram selecionados genótipos contendo um dos dois QTLs identificados e alguns BC2 foram autopolinizados para produzir sementes BC2Si (veja figura **2**). Duas populações BC2Si foram cultivadas: uma de 60 indivíduos BC2Si que segregaram para o QTL para incidência de doença e uma outra de **47**  
15 indivíduos BC2Si que segregaram para o QTL para crescimento de lesão.

### 3.2. Ensaio de caule

Um inóculo de *B. cinerea* linhagem B05.10 foi preparado de acordo com Benito (1998). O ensaio de caule foi realizado como descrito em Exemplo 1.

### 20 3.3. Isolamento de DNA e análise de marcador

DNA genômico foi isolado de duas folhas jovens (enroladas) usando um protocolo baseado em brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) de acordo com Steward e Via (1993), ajustado para isolamento de DNA de alta velocidade usando tubos micrônicos de um ml (Micronic BV, Lelystad, The  
25 Netherlands) e triturado usando um agitador Retsch 300 mm em velocidade máxima (Retsch BV, Ochten, The Netherlands). A análise AFLP (Vos *et al.*, 1995) de populações F2, BC2, BC3, BC4 e BC2Si foi feita e os fragmentos de AFLP foram separados em um seqüenciador de DNA LI-COR 4200, essencialmente seguindo o método publicado por Myburg (Myburg *et al.*

2001). O iniciador seletivo *Pst* foi marcado com um marcador fluorescente IRD 700 ou IRD 800. Imagens de gel de AFLP foram marcadas usando o pacote de aplicativo computacional AFLP-Quantar Pro (Keygene BV, Wageningen, The Netherlands). As dez combinações de iniciadores seguintes e seqüências adaptadoras foram usadas para genotipagem: P14M48, P14M49, P14M50, P14M60, P 14M61, P15M48, P18M50, P18M51, P22M50 e P22M51, como descrito por Bai *et al.* (2003).

### 3.4. Análise fenotípica da população $F_2$

Varição em incidência de doença entre os diferentes ensaios com *Botrytis* foi observada (Veja Exemplo 1, *acima*). Portanto sete ensaios de doença de caule consecutivos independentes foram realizados em 172 dos 174 indivíduos da população  $F_2$  derivados do cruzamento entre Moneymaker x LYC 4/78. Isto resultou em pelo menos cinco avaliações independentes do bioensaio de doença para praticamente cada genótipo  $F_2$ . Em cada bioensaio de doença individual seis segmentos de caule contribuíram para o cálculo do crescimento de lesão. Os valores médios para incidência de doença e crescimento de lesão para a população  $F_2$  mostraram uma distribuição normal (dados não mostrados). A incidência média de doença para Moneymaker é 59 % com um crescimento de lesão de 9,2 mm/dia. A incidência média de doença na população  $F_2$  variou entre 10% e 97% com uma média de população de 48%. Crescimento de lesão variou entre 3,3 mm e 11,5 mm/dia com uma média de 7,8 mm/dia.

Incidência média de doença de cada experimento individual variou de 31% a 73%, enquanto que o crescimento médio de lesão variou de 6,2 a 7,9 mm/dia (dados não mostrados). Crescimento de lesão pode ser calculado apenas se existe pelo menos infecção em um dos seis pedaços de caule. Conseqüentemente um aumento no número de genótipos informativos para crescimento de lesão pode ser observado com incidências maiores de doença. Por exemplo, com a incidência média de doença baixa (31%) apenas

52% dos genótipos foram informativos para crescimento de lesão.

### 3.5. Marcadores moleculares & Mapa de ligação genética

Um mapa de ligação genética foi calculado para uma população F2 (~ 174) derivada do cruzamento de Moneymaker x LYC 4/78.

5 Dez combinações de iniciadores foram usadas para obter 218 marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) na população F2 (n = 174). Um total de 69 marcadores (31,7%) pode ser prontamente marcado co-dominantemente, assim permitindo o cálculo de um mapa integrado de ligação genética de F2. Análise de marcador realizada em

10 genótipos BC2, BC3 e BCzSi permitiu a adição de uns 145 marcadores AFLP adicionais. Um total de 102 destes 145 marcadores AFLP adicionais foram previamente não marcados devido à complexidade dos géis de F2. O mapa de ligação genética geral consistiu de 315 marcadores AFLP de 14 grupos de ligação e tem um comprimento total de 958 cM. Uma vez que marcadores

15 AFLP co-migrantes dentro de uma espécie geralmente são alelo específicos, co-linearidade com outros mapas de ligação de AFLP foi usada para designar grupos de ligação para cromossomas. Alguns marcadores AFLP específicos de Moneymaker estavam em comum com os mapas de ligação genética como publicado (Haanstra et al. 1999; Bai et al. 2003) e portanto alguns grupos de

20 ligação podem ser assinalados para cromossomas, incluindo os grupos de ligação abrigando os QTLs identificados. Para melhorar o mapa de ligação nos intervalos de QTL, marcadores CAPS diagnósticos foram adicionados nestas regiões baseado no mapa publicado de *S. lycopersicum* x *L. pennellii* (Tanksley et al. 1992; Haanstra et al. 1999).

### 25 3.6. Análise de ligação e mapeamento de QTL

Dados de marcadores foram analisados e um mapa de ligação genética foi calculado como descrito em parágrafo 3.5.

O comprimento total do mapa de ligação de F2 foi 958 cM, o que é menor do que outros mapas interespecíficos de *Lycopersicon*

publicados com comprimentos genéticos variando de 1200-1400 cM (Foolad *et al.* 2002; Haanstra *et al.* 1999; Tanksley *et al.* 1992). Marcadores AFLP adicionais foram marcados usando dados de marcador AFLP obtidos a partir de retrocruzamento e populações BCzSi. Embora 46% mais marcadores tenham sido colocados no mapa de ligação, o comprimento do mapa de ligação genética não aumentou. A razão para isto é que os dados usados foram obtidos a partir de diversas subfamílias pequenas e assim não informativos para o cálculo de distâncias genéticas, mas estimação da posição é possível por inspeção visual dos genótipos gráficos (Van Berloo, 1999).

### 3.7. Mapeamento de QTL na população $F_2$

Os dados fenotípicos e de marcador foram usados para a identificação de QTLs por meio de mapeamento de intervalo (IM, veja parágrafo 3.5). IM foi aplicado tanto a dados obtidos de replicatas individuais como aos valores médios das replicatas.

#### Incidência de doença

Mapeamento de intervalo para incidência de doença na população  $F_2$  foi feito para aqueles testes individuais de doença com uma incidência média de doença menor do que 50% e para dados médios obtidos a partir de todos os testes de doença. Os dados médios de todos os testes geraram no procedimento de mapeamento de intervalo um único QTL significativo para incidência de doença (escore de probabilidade de chances (LOD) deve ser maior do que 3,4 para um amplo nível de confiança genômica de  $P < 0,05$ ). Este QTL teve um escore de LOD de 4,5 e explicou 13 % da variação fenotípica total. O alelo contribuindo para resistência foi originado do ancestral resistente LYC 4/78. Mapeamento de QTL em cada experimento individual gerou em todos os quatro casos a mesma região de QTL. Em cada experimento independente ocasionalmente outros "QTLs secundários" foram observados.

### Crescimento de lesão

Crescimento de lesão pode ser melhor medido naqueles testes de doença com uma alta incidência de doença. Para mapeamento de QTL a media de todos os testes de doença foi usada e um QTL para crescimento de lesão de *B. cinerea* foi identificado acima do limiar (LOD 3.4 para um amplo nível de confiança genômica de  $P < 0,05$ ). Este QTL teve um escore de LOD de 4,2 e explicou 12 % da variação fenotípica total. O efeito positivo foi originado do ancestral resistente LYC 4/78. A necessidade de realizar múltiplos testes de doença é ilustrada porque em apenas uma única repetição um perfil de LOD acima do limiar foi encontrado.

Um QTL para crescimento de lesão foi encontrado em cromossoma 1 (QTL-1h), e um QTL para incidência de doença foi encontrado em cromossoma 2 (QTL-2h). Estes QTLs, assim como o QTL chamado QTL4hA são o sujeito de pedido co-pendente PCTNL2005/000762.

#### 3.8. *Confirmação de BTLs em um bioensaio*

A planta F1 do cruzamento Moneymaker x LYC 4/78 foi retrocruzada duas vezes com Moneymaker e as 59 plantas de progênie foram monitoradas para a presença das duas regiões de QTL identificadas (QTL- 1h e QTL-2h) usando marcadores AFLP. Plantas, heterozigotas para um dos dois QTLs identificados, foram selecionadas e autopolinizadas para obter duas populações BC2Si. Um total de quatro bioensaios de doença foram realizados com cada genótipo BC2Si. Os dados de ambas as subpopulações de BC2Si, analisados com SPSS, mostraram distribuições normais para crescimento de lesão, mas não para incidência de doença como algumas subclasses foram observadas.

Todas as plantas BC2Si foram AFLP genotipadas com as mesmas 10 combinações de iniciadores como descrito para a população F2 em seção 3.3 acima. O crescimento médio de lesão na população segregando para o locus de crescimento de lesão foi 5,3 mm/dia enquanto que na outra

população um crescimento médio de lesão de 6,3 mm/dia foi observado. Nenhuma planta teve um crescimento de lesão tão baixo como o ancestral resistente LYC 4/78. Para incidência de doença, entretanto, plantas com uma incidência de doença menor do que o ancestral resistente LYC 4/78 foram observadas. A incidência média de doença para ambas as populações BC2Si foi igual (57-59%).

O efeito positivo de cada QTL foi confirmado nas populações BC2Si. O QTL para incidência de doença diminui a chance de infecção com 17 % (46 % da variação parental) e o QTL para crescimento de lesão reduziu crescimento fúngico com 1,3 mm/dia (33 % da variação parental).

Apenas uma parte da variação pode ser explicada pelo efeito de ambos QTLs. Alguns loci QTL adicionais ("secundários") foram identificados.

Durante análise de dados de testes de doenças obtidos tanto de genótipos F2 como BC2Si, um QTL principal para incidência de doença foi identificado (QTL-2'1.1). Além deste QTL, outros loci QTL "putativos" para incidência de doença foram identificados. Usando esta informação cofatores foram selecionadas para realizar um procedimento de 'mapeamento múltiplo de QTL' (MQM) restrito no conjunto de dados de F<sub>2</sub>. Nesta análise, um loci QTL adicional "secundário" para incidência de doença foi identificado (QTL-4hA). Um QTL é chamado como "secundário" quando seu escore é abaixo do limiar de significância de LOD 3,4. Acredita-se entretanto que os efeitos sejam efeitos reais de QTL.

QTL-4hA está localizado em cromossoma 4 e reduz incidência de doença.

### *3.9 Conclusões de ensaio de doença e mapeamento de QTL*

O bioensaio para medir resistência a *B. cinerea* provou ser uma ferramenta valiosa. Entretanto, uma ainda grande e desconhecida variação parece influenciar o desenvolvimento do processo infeccioso. Esta

grande variação não genética pode ser minimizada usando procedimentos padronizados e realizando muitas replicações independentes. A variação pode ser causada pelas condições de casa de vegetação mudando de semana para semana (comprimento do dia, horas de sol e temperatura) causando 5 diferenças em condições fisiológicas do caule. Também, pequenas variações na preparação do inóculo fúngico podem desempenhar um papel na variação do processo infeccioso. Outra observação é que o desenvolvimento da doença também pode ser afetado pelo microclima nas bandejas nas quais os pedaços de caule foram colocados. Dez diferentes 10 bandejas experimentais foram usadas para os bioensaios de BCzSi. Análise estatística foi usada para compensar a variação entre e dentro de experimentos. Experimentos com as maiores incidências médias de doença foram os mais informativos para medir crescimento de lesão enquanto que experimentos com uma incidência de doença mais moderada foram mais 15 informativos. Incidência de doença e crescimento de lesão são características independentes, uma vez que nenhuma correlação linear entre as duas características pode ser observada.

Loci de características quantitativas para resistência contra *B. cinerea* em tomate foram identificados na F2. Estes QTLs identificados foram 20 confirmados em populações BCzSi e explicaram 46% e 33% da variação parental para incidência de doença e crescimento de lesão, respectivamente. Estes resultados sugerem que nem todos os QTLs conferindo resistência para *B. cinerea* foram detectados na população original de mapeamento de F2. Em ambas populações BCzSi foram encontradas plantas com níveis maiores de 25 resistência que o ancestral resistente LYC 4/78. Isto é indicativo da presença de loci adicionais de resistência segregando na população BCzSi. Uma segregação adicional de resistência foi surpreendente porque poderia ser esperado que partes já grandes do genoma das duas populações BC2Si fossem MoneyMaker homozigotas.

### 3.10 Confirmação de efeito de QTLs individuais em condições de casa de vegetação

Plantas contendo qualquer dos QTLs descrito acima foram colocadas em um ancestral *S. lycopersicum* usando o método descrito em Figura 2. Linhagens BC2S2 foram colocadas na casa de vegetação em solo e cultivadas em condições de prática padrão na Holanda. Depois de 3 meses plantas foram inoculadas colocando um disco de ágar contendo *Botrytis* em uma lesão no caule principal. A lesão foi subsequentemente fechada usando Parafilm®. Três semanas depois de inoculação comprimento de lesão de caule foi medido (em cm) (Para mais detalhes veja abaixo). Resultados são listados em Tabela 7. Claramente, linhagens contendo o QTL para crescimento de lesão mostram uma extrema redução em tamanho de lesão.

**Tabela 7:** Comprimento médio de lesão de caule de lesões de *Botrytis cinerea* em plantas adultas de *S. habrochaites* acesso LYC 4/78 e *S. habrochaites* LA 1777, três semanas depois de inoculação.

Linha-gem	Repetição	Compr. da lesão de caule médio (cm)	Desvio padrão	Ancestral	Comentários/QTL
21	a***	4,2	1,1	GT	Controle suscetível
21	b	3,6	0,9	GT	Controle suscetível
22	a	3,0	0,0	Durinha	Controle parcialmente resistente
22	b	5,0	2,9	Durinha	Controle parcialmente resistente
23	a	5,6	3,0	Tradiro	Controle relativamente suscetível
23	b	6,0	3,3	Tradiro	Controle relativamente suscetível
26	a	3,2	0,8	BChirs3	QTL-2h
26	b	2,6	0,9	BChirs3	QTL-2h
26	c	2,6	1,3	BChirs3	QTL-2h
26	d	3,2	2,2	BChirs3	QTL-2h
28	a	2,6	0,5	BChirs5	QTL-1h
28	b	2,0	0,0	BChirs5	QTL-1h
28	c	2,0	0,0	BChirs5	QTL-1h
28	d	2,0	0,0	BChirs5	QTL-1h
373	e	4,3	0,6	LA 1777	QTL-10 contendo fonte de WO02/085105
373	f	4,3	0,2	LA 1777	QTL-10 contendo fonte de WO02/085105
374	e	4,8	0,6	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
374	f	4,5	0,0	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
375	e	4,2	0,3	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
375	f	4,2	0,2	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
376	e	4,3	0,3	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
376	f	5,0	0,7	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777

1777					
377	e	4,2	0,3	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
377	f	4,3	0,2	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
378	e	4,8	0,2	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
378	f	4,6	0,4	BC chrs 10	Linhagem de introgr. de <i>S. lycopersicum</i> x LA 1777
68	e	2,0	0,0	parv1	QTL-3p + QTL-4p
68	f	2,0	0,0	parv1	QTL-3p + QTL-4p
78	e	2,0	0,0	parv2	QTL-9p + QTL-4p
78	f	2,0	0,0	parv2	QTL-9p + QTL-4p

\*\*\*) a, b, c e d são repetições através das quais cada repetição representa 5 plantas; e e f são repetições através das quais cada repetição representa 3 plantas; GT é Moneyberg com resistência a TMV; Durintha é um híbrido com resistência parcial de acordo com cultivadores; Tradiro é um híbrido, susceptível a *Botrytis* de acordo com cultivadores; BChirs indica linhagens de retrocruzamento resultando de introgressões de *S. habrochaites* LYC 4/78; LA 1777 é acesso de espécie selvagem *S. habrochaites* LA 1777; BC chrs 10 indica linhagens de retrocruzamento com introgressão em cromossoma 10 de *S. habrochaites* LA 1777; parv indica linhagens resultando de introgressões de *S. neorickii*.

5 3.11. O nível de resistência a *Botrytis* conferido por QTLs de *S. habrochaites* LYC 4/ 78 é maior do que o nível de resistência conferido por QTLs de *S. habrochaites* LA 1777 em cromossoma 10.

10 O nível de resistência em plantas contendo os QTLs de *S. habrochaites* LYC 4/78 descritos neste lugar foi comparado com aquele de *S. habrochaites* LA1777, a fonte de Patente Internacional 02/085105 que contém um QTL para resistência parcial a *Biotrytis* em cromossoma 10, e com  
15 linhagens de introgressão derivadas a partir desta com introgressões em cromossoma 10.

20 Linhagens foram colocadas na casa de vegetação em solo e cultivadas em condições de prática padrão na Holanda. Depois de 3 meses plantas foram inoculadas colocando um disco de ágar de 0,5 cm x 0,5 cm contendo *Botrytis* em uma lesão vertical de caule de 2 cm de comprimento no caule principal. A lesão foi subseqüentemente fechada usando Parafilm®. Três semanas depois de inoculação comprimento de lesão de caule (comprimento de tecido descolorido semeado com crescimento fúngico) foi  
25 medido (em cm) do topo da lesão ao fundo da lesão. Resultados são listados em Tabela 7. Foi observado que linhagens contendo os QTLs de *S.*

*habrochaites* LYC 4/78 mostraram um maior nível de resistência a *Botrytis* do que a LA 1777 fonte e linhagens IL. Linhagens ancestrais mostraram menos crescimento de lesão no caule e portanto exibiram um maior nível de resistência a *Botrytis* do que as linhagens derivadas de LA 1777 (Veja Tabela 7). Onde um comprimento de lesão de 2,0 cm é registrado, apenas a lesão original pode ser medida e nenhum crescimento fúngico foi observado, o que indica um alto nível de resistência. Assim, a comprimento de lesão de caule de 2 cm indica ausência de crescimento líquido.

**Exemplo 4.** Mapeamento de resistência parcial a *Botrytis cinerea* em uma população interespecífica de tomate (*S. lycopersicum* cv Monevmaker x *S. habrochaites* acesso LYC 4/78)

#### **Introdução.**

A fim de contribuir para um processo de melhoramento mais efetivo, envolvendo a seleção de plantas parentais candidatas tendo a constituição genética apropriada, é necessário ter à disposição de alguém um ou mais marcadores genéticos que indicam a presença de tal constituição genética em pelo menos uma das plantas parentais candidatas. Este processo, o que inclui cruzamento das plantas selecionadas e é denominado seleção auxiliada por marcador (MAS), transfere eficientemente alelos parentais favoráveis de uma população doadora para uma receptora e assegura que o melhoramento não seja mais dependente de coincidência seja economicamente muito mais efetivo em termos de custos de desenvolvimento.

Resistência a *B. cinerea* foi identificada no acesso selvagem *Solanum habrochaites* LYC 4/78 (Urbach, 1986; Exemplo 1). Para estudar a genética por trás desta resistência, uma população de mapeamento F2 (n=174) do cruzamento entre *S. lycopersicum* cv. Moneymaker e *S. habrochaites* LYC 4/78 foi desenvolvida (veja Exemplo 3). Inicialmente, dois QTLs para resistência a *B. cinerea* foram identificados no estudo de mapeamento de F2

(QTL-1h e QTL-2h como descrito acima). Depois um terceiro QTL (QTL-4hA) foi detectado em progênie BCzSi segregantes, um QTL cujo efeito só pode ser observado na ausência de QTL-2h. Usando uma análise ANOVA de 2 vias uma interação epistática significativa entre ambos QTLs foi identificada no conjunto de dados de F<sub>2</sub>. Algumas classes genótípicas são representadas em uma baixa frequência e portanto grandes populações F<sub>2</sub> são necessárias para detectar interações de QTL (Tanksley 1993). Em população F<sub>2</sub> de requerentes, três plantas foram *S. lycopersicum* homozigotas para QTL-1h e QTL-2h enquanto que 12 plantas foram *S. habrochaites* homozigotas para ambos. Usando uma ANOVA de 2 vias, uma interação significativa foi detectada entre ambos loci. Análise de observações médias de cada uma das classes mostrou que quando QTL2 é *S. habrochaites* homozigotamente não existe nenhum efeito adicional de QTL-4bA.

Uma desvantagem de mapeamento de QTL em populações interespecíficas F<sub>2</sub> segregantes é a ampla variação de fenótipos que facilmente mimetiza QTLs com efeitos secundários. Outra desvantagem é a incapacidade de fazer testes repetidos pois cada planta F<sub>2</sub> é um genótipo único. Alternativamente, uma biblioteca genética consistindo de um conjunto de linhagens de introgressão (IL) pode ser usada para propósitos de mapeamento. Cada IL idealmente abriga um único segmento cromossômico definido que se origina da espécie doadora em uma constituição genética de outra maneira uniforme (Zamir 2001). Tais linhagens têm uma capacidade aumentada de identificar QTLs por causa de: I) variação fenotípica entre a linhagem e a cultivar de controle está associada com o segmento introgridido; II) cada linhagem contém principalmente mais do que 95% do genoma parental cultivado recorrente e efeitos quantitativos secundários podem ser facilmente identificados por comparação com o genitor recorrente; III) efeitos epistáticos causados por outras regiões do genoma selvagem não estão presentes. Interações epistáticas negativas pode assim levar a identificação de

novos QTLs (Eshed et al. 1995); IV) cada linhagem é homocigota e imortal e assim permitindo múltipla verificação (em múltiplos ambiente) e V) problemas de esterilidade são praticamente ausentes devido ao fato de que a constituição genética de cada linhagem ser amplamente idêntica à variedade cultivada.

5 A primeira população de IL já desenvolvida data de 1965 (Wehrhahn et al.), a maioria das populações de IL foram desenvolvidas durante a última década. Além de tomate, populações de IL foram desenvolvidas para cevada (von Korff et al. 2004), repolho (Ramsay et al. 10 1996), alface (Jeuken et al. 2004), melão (Eduardo et al. 2005), arroz (Lin et al. 1998) e trigo (Pestsova et al. 2001). Todas estas populações de IL foram desenvolvidas usando seleção auxiliada por marcador (MAS), mas diferentes estratégias indicadas pelos diferentes números de retrocruzamentos e gerações de endogamia para obter as populações de IL foram usadas. Uma segunda 15 diferença na estratégia foi a escolha de qual sistema marcador (i.e. que tipo de marcadores) foi usado para desenvolver a população de IL. Quatro das populações mencionadas acima foram desenvolvidas usando marcadores SSR.

Dentro de *Solanum*, ILs foram desenvolvidas para *Solanum pennellii* LA716 (Eshed et al. 1994), *S. habrochaites* LA1777 (Monforte et al. 2000a) e *Solanum lycopersicoides* LA2951 (Canady et al. 2005). Tais 20 populações mostraram ser extremamente úteis na identificação de características quantitativas (Eshed et al. 1995; Rousseaux et al. 2005), mapeamento fino de QTLs (Fridman et al. 2004; Monforte et al. 2001; Monforte et al. 2000b) e clonagem de QTL (Frary et al. 2000; Fridman et al. 25 2000; Ku et al. 2001).

Atualmente, uma população de *S. habrochaites* LA1777 IL existe em um *S. lycopersicum* E6203 de crescimento determinado (Monforte et al. 2000a).

Neste Exemplo é descrito o desenvolvimento de uma segunda

população de IL de *S.habrochaites*, agora baseada em introgressões de *S. habrochaites* LYC 4/78 no ancestral do tomate cultivado de crescimento indeterminado *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, e o uso das linhagens na identificação de QTLs para resistência a *B. cinerea*.

## 5 **Material & Métodos**

### *Material vegetal e desenvolvimento das ILs*

Um cruzamento interespecífico entre *S. lycopersicum* cv. Moneymaker (daqui por diante referido como SL) e *S. habrochaites* LYC 4/78 (daqui por diante referido como SH; grupo de sementes de 1978) foi  
10 feito para produzir sementes F1. Sementes de SH foram obtidas a partir do banco de genes localizado no Institute for Plant Genetics and Crop plant research, Gatersleben, Alemanha. Uma planta F1 foi autopolinizada para obter sementes F2 e retrocruzada com SL para obter sementes BCi. As sementes F2 foram inicialmente usadas para a construção do mapa de ligação  
15 genética. As sementes BCI foram usadas para desenvolver as ILs (Figura 6).

### *Análise de marcador*

DNA genômico foi isolado de duas folhas jovens (enroladas) usando um protocolo baseado em CTAB de acordo com Steward et al. (1993), ajustado para isolamento de DNA de alta velocidade usando tubos micrônicos de  
20 um ml (Micronic BV, Lelystad, The Netherlands) e triturado usando um agitador Retsch 300 mm em velocidade máxima (Retsch BV, Ochten, The Netherlands).

Análise AFLPTM (Vos et al. 1995) de cada retrocruzamento e IL foi feita e os fragmentos AFLP foram redissolvidos em um seqüenciador de DNA LI-COR 4200, essencialmente seguindo o método publicado por  
25 Myburg (2001). O iniciador seletivo *Pst* foi marcado com um marcador fluorescente IRD700 ou IRD 800. Imagens de gel de AFLP foram marcadas usando o pacote de aplicativo computacional AFLP-Quantar™ Pro (<http://www.keygene-products.com>). Seqüências de iniciador e adaptador são descritas por Bai et al (2003).

Conjuntos de iniciadores CAPS foram obtidos a partir do "Solanaceae Genomics Website" (<http://snn.cornell.edu>) ou concebidos em seqüências de clones genômicos ou de cDNA disponíveis a partir da mesma fonte. Polimorfismos entre *S. habrochaites* e *S. lycopersicum* foram determinados usando a abordagem de digestão de CAPS descrita por Brugmans et al (2003). Seqüências marcadoras, condições de PCR, e endonucleases de restrição específicas usadas para genótipo são apresentadas em tabela 30. Produtos de PCR geralmente foram separados usando um gel de agarose a 2,5%. Em Tabela 31 os diferentes produtos de digestão que discriminam entre *S. lycopersicum* e *S. habrochaites* são indicados para cada um dos marcadores de Tabela 30 encontrados nos QTLs de interesse.

#### *Genótipo gráfico*

Genótipos gráficos para cada retrocruzamento e as ILs foram obtidos usando o programa de aplicativo computacional GGT (van Berloo, 1999). Para o cálculo de tamanho de introgressão e porcentagens de genoma, os meio-intervalos flanqueando um locus de marcador foram considerados como sendo da mesma introgressão que implementada pelo aplicativo computacional GGT. Dados ausentes de marcadores foram estimados a partir dos marcadores flanqueadores; eles foram assumidos como tendo o mesmo genótipo dos dois marcadores flanqueadores, se estes tivessem genótipos idênticos. Se os dois marcadores flanqueadores tivessem genótipos contrastantes, então os dados foram registrados como ausentes.

#### *Avaliações de doença*

Para verificar resistência, 16 blocos aleatorizados incompletos foram usados com um total de 11 replicações para cada IL. Cada bloco conteve pelo menos duas plantas SE e uma planta de *S. lycopersicum* cv. Durinta. Durinta é uma cultivar comercial que produz tomates conduzidos com um cacho com uma longa expectativa de vida e apresenta um certo (mas não alto) nível de resistência. Seis semanas depois de semeadura, plantas

foram transplantadas para compartimentos vivos do solo e cultivadas em um regime de 15 graus a noite/19 graus durante o dia e um fotoperíodo de 16 horas. Depois de 11 semanas, duas lesões de aproximadamente 15 mm foram cortadas no caule de cada planta usando uma faca de cozinha. Cada lesão foi inoculada com um tampão de 1 cm<sup>2</sup> de *B. cinerea* B05.10 contendo ágar (Benito et al (1998)), e fechado com fita. Uma segunda inoculação foi realizada duas semanas depois. Durante o teste, plantas foram regadas no fim da tarde para manter um clima úmido durante a noite. Progresso de doença foi medido 9, 12 e 22 dias depois de inoculação usando um compasso de calibre. O progresso de doença foi descrito de acordo com os seguintes parâmetros: tamanho de lesão corrigido (LS) depois de 12 dias (i.e., o comprimento total da lesão menos 15 mm da lesão), porcentagem de lesões crescentes (DI), e taxa de crescimento de lesão expressa como a diferença em tamanho de lesão corrigido medido em dias 9 e 12 e expressa em mm/dia (LG).

#### 15 *Análise estatística*

Análise estatística foi realizada usando o pacote de aplicativo computacional SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, U.S.A.). Usando o procedimento de modelo linearizado geral (GLM), médias para cada IL / característica foram estimadas. Valores médios das características medidas foram comparados com o genótipo de controle SL usando um teste de Dunnett (Dunnett, 1955) e probabilidades menores do que 0,05 foram consideradas como significantes. Para analisar LG e LS, uma transformação de raiz quadrada foi aplicada aos dados de ambas as características. Correlações entre características foram calculadas usando um coeficiente de correlação de Pearson.

#### 25 **Resultados**

##### *População de IL*

Uma população de linhagem de introgressão (IL) de *S. habrochaites* LYC 4/78 (SH) na constituição genética de *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker (SL) foi desenvolvida. Uma planta F1 derivada do cruzamento

entre SL e SH foi retrocruzada com SL (Figura 6).

Subseqüentemente um conjunto aleatório de 14 plantas BC<sub>i</sub> foi retrocruzado com SL para obter uma progênie BC<sub>2</sub> (n=59). Todas as plantas BC<sub>2</sub> foram genotipadas e um conjunto selecionado foi retrocruzado com SL. Este conjunto foi escolhido de uma maneira tal que as introgressões combinadas cobriram tanto quanto possível do genoma SH enquanto selecionando recombinantes de uma maneira tal que cada cromossoma exógeno será representado por três ILs. Este processo de seleção e retrocruzamento foi repetido até BC<sub>5</sub>. 31 plantas BC<sub>5</sub> selecionadas, principalmente contendo uma ou duas introgressões foram autopolinizadas. Até 12 plantas de cada uma das 31 famílias de BC<sub>5</sub>S<sub>1</sub> foram autopolinizadas e monitoradas com marcadores AFLP para obter uma progênie BC<sub>5</sub>S<sub>2</sub> (n=44) homozigota para a introgressão. Os marcadores das 44 ILs foram monitorados mais uma vez e um conjunto central de 30 ILs foi escolhido. Este conjunto central representa a cobertura máxima do genoma SH em tão poucas ILs quanto possível (Figura 7). O conjunto central consiste de 15 ILs abrigando uma única introgressão, 10 ILs contendo duas introgressões, 4 ILs contendo três introgressões enquanto que uma IL ainda conteve quatro introgressões homozigotas. Em média cada IL conteve 60 cM (= 5,2 %) do genoma SH e o comprimento das introgressões variaram entre 20 (1,7%) e 122 cM (10,6%). A população de IL da invenção cobre 95% do comprimento do mapa de ligação original de F<sub>2</sub>. Entretanto, sabe-se que este mapa de ligação de F<sub>2</sub> não está cobrindo completamente o genoma. Isto é ilustrado por análise CAPS adicional em cromossomas 3 (topo do braço curto), 4 (topo do braço curto), 5 (braço longo) e 9 (topo do braço curto) onde marcadores CAPS revelaram introgressões sem nenhum marcador no AFLP baseado no mapa de ligação de F<sub>2</sub>. O tamanho das mesmas introgressões foi estimado baseado no mapa RFLP de alta densidade (Tanksley et al. 1992; <http://www.sgn.cornell.edu>). Uma vez que nenhum monitoramento prévio foi aplicado ao topo de Cromossoma 3 a IL para esta região é heterozigota. Plantas, selecionadas para serem homozigotas SH para IL5-1 e 5-2 falharam no

estabelecimento de sementes portanto estas linhagens foram mantidas em seu estado heterozigoto. Nenhuma IL contendo o topo do braço curto de Cromossoma 8 e o fundo do braço longo de Cromossoma 2 esteve presente. Introgrossões, no topo do braço curto de Cromossoma 7 e 9 estão presentes em múltiplas ILs. Seleção para o topo de Cromossoma 9 foi possível apenas depois de desenvolvimento de marcadores CAPS específicos para esta região.

### *Avaliações de doença*

A população de 30 ILs foi cultivada em onze replicatas em um modelo de bloco aleatorizado incompleto, inoculada e avaliada para sintomas de doença. Um conjunto de controles claramente resistentes e susceptíveis foi incluído no teste. Em 9, 12 e 22 dias depois de inoculação o progresso de doença foi medido e avaliado pontuando os seguintes três parâmetros: Chance de infecções crescentes, ou incidência de doença (DI), tamanho corrigido da lesão crescente (LS) e taxa de crescimento de lesão (LG). O ancestral resistente SH dificilmente mostrou qualquer sintoma (Tabela 8, Tabela 9) enquanto que 73% das lesões SL foram crescentes.

**Tabela 8:** Observações fenotípicas médias para LS, LG e DI das ILs mais resistentes e linhagens de controle. Médias de cada IL por característica (Tabela 9) foram comparadas com a média de *S. lycopersicurn* cv Moneymaker (SL) usando um teste de Dunnett e diferenças significantes são marcadas com \* ou \*\* ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ , respectivamente).

IL	N	Tamanho da lesão corrigido <sup>a</sup> (mm) LS		Crescimento da lesão <sup>a</sup> (mm/dia) LG		Lesões crescente (%) DI	
1-3 / 3-3	29	30	**	1,7	**	45 ± 9,1	**
1-4	44	34		2,4	*	37 ± 6,4	**
2-2	44	26	*	2,8		37 ± 6,5	**
4-1	44	26	**	2,5	*	41 ± 6,4	**
6-1	44	44		3,6		49 ± 6,5	*
9-2	44	33		3,1		49 ± 6,4	*
11-2	44	33	*	3,2		34 ± 6,4	**
12-3	24	21	**	2,3		24 ± 8,6	**
SL	156	46		4,6		73 ± 4,0	
SH	44					-3 ± 6,4	**
DRS5	39	20	*	ND <sup>b</sup>		15 ± 6,9	**
Durinta	68	29	**	2,3	**	42 ± 5,5	**

<sup>a</sup>, primeira observação de uma lesão mensurável foi depois de 12 dias. <sup>b</sup>, Não determinado

**Tabela 9:** Observações fenotípicas médias estimadas para LS, LG e DI. A tabela é ordenada em DI. Médias de cada IL por característica foram comparadas com a média de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker (SL) usando um teste de Dunnett e diferenças significantes são marcadas com \* ou \*\* (p<0,05, p<0,01 respectivamente).

IL	N	Tamanho da lesão corrigido <sup>a</sup>		Crescimento da lesão <sup>a</sup> (mm/dia)		Lesões crescentes (%)	
		(mm)		LG		DI	
		LS					
12-3	24	21	**	2,3		24 ± 8,6	**
11-2	44	33	*	3,2		34 ± 6,4	**
1-4	44	34		2,4	*	37 ± 6,4	**
2-2	44	26	*	2,8		37 ± 6,5	**
4-1	44	26	**	2,5	*	41 ± 6,4	**
2-1	44	30	*	3,0		41 ± 6,4	**
1-3 /	29	30	**	1,7	**	45 ± 9,1	**
3-3							
4-2	42	33		3,8		45 ± 6,7	*
3-2	44	35		4,2		46 ± 6,5	*
3-1	43	41		2,8	*	47 ± 6,6	
1-2	40	33		3,4		47 ± 6,7	
11-1 /	44	36		4,3		48 ± 6,5	*
9-3							
9-2	44	33		3,1		49 ± 6,4	*
6-1	44	44		3,6		49 ± 6,5	*
7-1	44	35		3,1		50 ± 6,4	
4-3	20	29		2,8		51 ± 9,6	
12-1	44	35		4,7		51 ± 6,4	
12-2	43	37		4,0		52 ± 6,4	
6-2 / 7-	44	39		3,7		55 ± 6,3	
2							
2-3	44	44		3,5		58 ± 6,5	
8-3	44	43		3,9		59 ± 6,5	
10-1	43	47		4,3		60 ± 6,6	
5-1	44	53		4,8		61 ± 6,6	
10-2	44	49		4,4		62 ± 6,5	
1-1	41	56		5,9		65 ± 6,7	
9-1	44	34	*	3,0	*	69 ± 6,5	
5-2	43	64		5,4		69 ± 6,6	
10-3	44	53		4,7		70 ± 6,4	
10-4	44	47		4,8		76 ± 6,6	
6-3	44	49		4,6		79 ± 6,5	
SL	156	46		4,6		73 ± 4,0	
SH	44					-3 ± 6,4	**
DRSS	39	20	*	ND <sup>b</sup>		15 ± 6,9	**
Durinta	68	29	**	2,3	**	42 ± 5,5	**

Dentro da população de IL 14 ILs foram identificadas com sintomas reduzidos de doença (Tabela 9). Um total de 12 ILs mostrou um DI menor significativo. Sete tiveram LS significativamente reduzido e cinco um LG menor significativo. IL4-1 e IL 1-313-3 mostraram uma redução significativa de todos os três parâmetros (DI, LG e LS). Nas ILs inferiores significantes para DI a variação em porcentagem de lesões crescentes foi de 24 - 49%. LS e LG variaram para as ILs significativamente desviantes entre 21-34 mm e 1,7-3,0 mm/dia respectivamente. O controle *S. lycopersicum* cv.

Durinta, com um certo nível de resistência, também foi significativamente menor para todos os três parâmetros e a resistência em cada uma das sete ILs identificadas é mais ou menos comparável a este nível. Em experimentos prévios um genótipo BC2S2 muito resistente foi selecionado @RS 5, veja Tabelas 8 e 9). Esta linhagem contém três introgressões homozigotas representando no total 18% do genoma SH (Figura 7). Esta linhagem foi a linhagem mais resistente no teste descrito acima. Ela teve uma DI significativamente menor (15 %) e o LS também foi significativamente reduzido. Comparado com *S. lycopersicum* cv. Durinta, a DI 2,8 vezes reduzida desta linhagem é significativamente menor mostrando o potencial de piramidização múltiplos alelos conferindo resistência para *B. cinerea*.

#### *Efeito de sobrepor introgressões*

Ao analisar as várias introgressões presentes em linhagens IL individuais (Figura 7) e comparando estas com seus efeitos individuais em resistência como mostrado em Tabela 9, alguém pode inferir os efeitos de sobreposição. Como pode ser visto em linhagens 9-1, 9-2, 11-2 e 12-3 a sobreposição de introgressões pode ter efeito.

Por exemplo, é concluído que a introgressão em cromossoma 6 em linhagem 9-2 não tem nenhum efeito, uma vez que uma introgressão idêntica em linhagem IL6-3 não fornece nenhuma resistência.

Da mesma maneira, uma introgressão em cromossoma 7 em linhagem 11-2 não tem nenhum efeito (compare a linhagem 7-1 e 8-2).

Os dois padrões de resistência (DI e LS) como presentes em 11-2 não são o resultado da introgressão em cromossoma 11 apenas. A redução em tamanho de lesão (LS) nesta linhagem pode ser devido a uma introgressão de cromossoma 9 (compare introgressões similares em 9-1 ao passo que uma redução em incidência de doença nunca é encontrada em associação com a introgressão de 9-1 apenas. Portanto, a redução em incidência de doença deve ser devido à introgressão de cromossoma 11.

Assim, em linhagem 11-2 a resistência total é o resultado de várias introgressões.

5 Similarmente, % reduzida de lesões crescentes em linhagem 12-3 comparada com linhagem 9-1 pode ser devido à introgressão em cromossoma 12, ao passo que o tamanho de lesão correto reduzido pode ser devido à introgressão de cromossoma 9. Portanto, também aqui a presença combinada de múltiplas introgressões resulta em resistência melhorada.

*Dados de ligação entre IL e doença*

10 Usando um bioensaio de casa de vegetação foi identificado um conjunto de ILs contendo introgressões responsáveis por uma resistência aumentada a *B. cinerea*. Três regiões, localizadas em cromossoma 2,4 e 6 inequivocamente contêm um(uns) gene(s) para resistência aumentada. As outras ILs contêm múltiplas introgressões tornando mais difícil detalhar exatamente os genes de resistência. IL9-2 contém introgressões em  
15 cromossoma 6 e 9. A introgressão em cromossoma 6 em IL9-2 é similar à introgressão de Cromossoma 6 em IL6-3, uma IL tão susceptível quanto SL. Assim, é esperado que o efeito de IL9-2 seja causado pela introgressão em cromossoma 9 e não em cromossoma 6. IL11-2 contém uma introgressão em  
20 cromossoma 9 menor do que presente em IL9-1. Portanto, é esperado que a DI reduzida seja causada por um locus em cromossoma 11. As duas ILs 1-4 e 12-3 contêm introgressões sobrepondo a introgressão de Cromossoma 9 de IL9-2. Apenas IL12-3 é significativamente mais resistente do que IL9-2 sugerindo um efeito combinado das introgressões em cromossoma 9 e 12. Uma vez que, ILs 1-4 e 11-2 não são significativamente mais resistentes do  
25 que IL9-2 não se pode excluir que resistência dentro das mesmas duas linhagens é o resultado da introgressão de Cromossoma 9.

Resumindo, foram identificadas introgressões localizadas em cromossoma 1, 2, 4 (2x), 6, 9, 11 e 12 que são responsáveis por uma resistência aumentada a *B. cinerea*. Os efeitos em cromossoma 2 e um em

cromossoma 4 foram previamente detectados durante análise de **F2** e populações de BCzSi segregantes deste cruzamento (veja Exemplos 1-3).

*Segregação na F2 de loci identificados*

Para todas as regiões, nas quais uma associação é encontrada entre a introgressão e uma resistência aumentada a *B. cinerea*, o conjunto de dados original de **F2** foi verificado para encontrar uma explicação possível por que o QTL inicialmente foi perdido. Tanto obliquidade dos dados de marcadores como resultados da análise QTL foram verificados. Introgressões em cromossoma 1 (1:6:6), Cromossoma 2 (1:3:2) e Cromossoma 9 (1:6) foram significativamente desviantes das proporções esperadas de 1:2: 1 ou 1:3. Para todas as três regiões, uma ausência de alelos homozigotos de *S. lycopersicum* é observada. Dados de análise QTL tanto para mapeamento de intervalo como análise de marcador único usando um procedimento de Kruskal-Wallis foram verificados mas nenhuma evidência foi encontrada sobre a existência de um QTL significativo no conjunto de dados da população **F2** em cromossoma 6, 9, 11 e 12.

Seqüências marcadoras como usado neste lugar.

As Tabelas seguintes fornecem informação detalhada sobre vários marcadores RFLP e COS-II como indicado nos vários mapas de ligação e como indicado para associação com os QTLs da presente invenção. A informação foi diretamente copiada a partir do banco de dados de SOL Genomic Network (SGN) hospedado em Cornell University, versão de 7 de Outubro de 2005.

**Tabela 10**

**Marcador TG609            RFLP**

**Informação RFLO**

**Nome:** TG609

**Tamanho do inserto:** 1900

**Vetor:** pGEM4Z

**Sítio de corte: PST1**

**Resistência a droga: AMP**

**Seqüência direta**

GAGACAGCTTGCATGCCTGCAGAGGTGATAAATTCACCAAGGTTTCATATTTAGGAAACAAG  
AAAATTAAAAGATCATTAACACAGATGA  
AAGGATATGACTAGGAGGCAATGACTGATCTTTGACTATCAAATACTTCTCAGGGAAACAAT  
GTGAATGGGCTTTTACATGCAGAGATAT  
TGATTGTGATCATGTTGAAGAACTTAGGAAACATGAAATTAATGATCATTAACACTGATGC  
AAGGATATGCCAAGTAGGCAAGCAAATT  
AAGGTTGAACATAAATGTCTGTGATCTTTGACTATCAAATATCTTCTCAGAAAAAAAAAATGT  
GAATGCTCATTTACATGCAGAGATGGCT  
ATTGTGATCATGTGGCTCAGCCTTGAGTCTATATTGAGGTGCAGACAACATAGTCCCTAACC  
ACATGTGTGATCAAGCAACTTTTTTGAT  
GTCCACAGGGTTATAAGTAGGCAACATTTAAGCAAGAAAAACACAGGATCACTATTGAGT  
CAGCTGCTGTTGCCTGT

**Seqüência reversa**

GGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGAGGTGATAAATTCACCAAGGTTTCATATTTAGGAAACA  
AGAAAATTAAAAGATCATTAACACAGAT  
GAAAGGATATGACTAGTAGGCAATGACTGATCTTTGACTATCAAATACTTCTCAGGGAAACA  
ATGTGAATGGGCTTTTACATGCAGAGAT  
ATTGATTGTGATCATGTTGAAGAACTTAGGAAACATGAAATTAATGATCATTAACACTGAT  
GCAAGGATATGCCAAGTAGGCAAGCAA  
TTAAGGTTGAACATAAATGTCTGTGATCTTTGACTATCAAATATCTTCTCAGAAAAAAAAAAT  
GTGAATGCTCATTTACATGCAGAGATGG  
CTATTGTGATCATGTGGCTCAGCCTTGAGTCTATATTGAGGTGCAGACAACATAGTCCCTAA  
CCACATGTGTGATCAAGCAACTTTTTTG  
ATGTCCACAGGTTTATAAGTAGGCAACATTTAAGCAAGAAAAACACAGGATCACTATTGA  
GTCAGCTGCTGTTGCCTGTTACTGAG

**Tabela 11****Marcador TG62 RFLP****Informação RFLP****Nome:** TG62**Tamanho do inserto:** 1800**Vetor:** pUC**Sítio de corte:** PST1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

CAAAATGCTTCAGCTACTGGCTAAATGAAGTATGTTCTCAACATATTCACAAGCTTCTGTCT  
 TCGAAGCTCAAGAAGTGTTCGGTATTATC  
 TGAATTAATAGTAAAGCAAAGAGATGGTTTTATGTTTCTTAAGCAGCATTCTTAGCTTAA  
 CGGCCCTCCAGATATATGGTGGACAAA  
 TAGAATCCATTAGATATAACAAATGGGATTAGTATAATGATCTTTACTTTGTTAGATGATC  
 ATACTAACAGATTGCAAGTTAATCATAT  
 CCAACATATTCTGTAGATATTTACATTGGCTAGCATGAGGAAAGGTCATGTAGGAAATTG  
 AATAGAGTTCAATTTTGGGAAAAGTTGCA  
 TTGAAGAAGGTAACCTCAACAAACGTGTGAAAAAATCACATTTGAGTTGCCCGCTCACCAT  
 CGTGATTCCAGTACGAACTACTCAAAAAT  
 TTTACTTTTGAGCCTTAAACATCATTTTAAGCCTTGAAAAGCTGCTTTTGAAAAGATCTAAGC  
 AAGAT

**Seqüência reversa**

GGAGAATATTGTCACTCTATCAGATAGTTCAAAACTATCGGAGAATGAAATGGTCAATTCT  
 TCTCACAAAGATATTCATGCCTAGTTGCAG  
 TGTC CGAATTAACATAACATGCTCAATTTTCATATCTTGCAGCAAAATTTATCATTGAAACT  
 CTCTGAGATGGAAACAGAGAACAAAGAC  
 CATATTGGAAAGCTTCAATCAGACATGCAGAAAAAGGAAGATGAGATTCATGTTTTACGC  
 AAGGAAATTGACAATTACACGGAAACAGTG  
 GATTCAGTGGAGAAGCATGTTACAGAGATTAACAATAAATTGGAGGAGAAAGATCAGCTT  
 GTTCAGGAACTTCAGGACAAGGAGAAGCAG  
 TTGGAAGCTGACAGAGAAAAGGTTTTACTACGGATACTTTTAGTTCTACAAATTCTATTA  
 TAACCAATACAATGTGTTCAAGTGACTAG  
 TGTTTTGCACCTTGTTGCAGATTCAGGCATCTTTGCTTGCTGCTGAAAGCAAGCTCACAGA  
 ATCCAAAAAGCAGTATGATCAGATGT

**Tabela 12****Marcador TG555 RFLP****Informação RFLP****Nome:** TG555**Tamanho do inserto:** 1600**Vetor:** pGEM4Z**Sítio de corte:** PST1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

AATTCGGAGCTCACTGCTTCTAATCCTCAGTGAGACTTATTTTCTACATATTAACAATAAGA  
 AATTTACGAAGGAATATTATAGACTGA  
 ATTCCTTGGTGACAAGTATCAAGACATCTTGACCAAGTTTAAAGTTTTGTAGTGGCAGTTCTT  
 TTAAGCTTTACTTGTGTGAGGTAGACA  
 TCAAGGAAGATAAGTAGCAGCTACTCTTCACGGAGCAGCCCATAGGACACTCAAATTCCT  
 ATTGCGAGGGTCAATCTACCAATTTATGG  
 AACGATACCAGTAAAGTCATTTTTATGTAAACATCAGACAGCTTTTGACTAAGCAGAGACAT  
 GAATAAGTTCTATTTGTTAGAAGTCGAA  
 GAGACAAATAAGTTAATTTACCTATGCTATAAAAGAGGACTCTTATAGTTATAAATACAGT  
 ACATTTTATTAAGGGTTCTAATTGTTGA  
 CTATGATAGCAAGCATGCCGTAATAATT

**Seqüência reversa**

ACATTTTGAGGAAGACAGGAGTTATGTATCGCCATCTGGTGTGCTCCAAGAACATGACAGAT  
 ATAAAAGACCGCGGGGTGCACCAGAGAA  
 ATGTTGCATTGGAGCATATTGAACATCATAGGCTCAATGGAATTGTTTACTTTGCAGATGAT  
 GATAATATCTACTCACTTGAGTTGTTTG  
 AGAGCATTAGATCGATCAAGTAAGTTGAGATTCATCAGTCTTGTTTACATGACTTGTCTTTGT  
 TTTGTCCTGCTGTGAGCATGTTTCAGGA  
 TGATGTTATGTGCTTTATGTAGATGTTCAAGTCGATAATAGTGAATAGTCTAGAGCTATTTCA  
 CATATATTACAACCTTCACTAACAAATT  
 CTTTTCCTGGTGCCTCGGTTTCATCACTCTTCATAGTTATAAGAATAACAGTTGTAGATTAGA  
 CCACTGGTCGTGTGATTTTTGGACTTA  
 ATTATTATCTCAATTCCTCCTCAAATAGCAGTCCTTAGATTAGAAGCTGAGG

**Tabela 13****Marcador CT50 RFLP****Informação RFLP****Nome:** CT50**Tamanho do inserto:** 1600**Vetor:** pBLUESC**Sítio de corte:** EcoR1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

CTTTTTTTTTTTTTTTATATATTGTGGTATAGATTATTATATAATAACAAGGTGAATTAACATG  
 AGAAATGAATAATTGTCACATTCTTG  
 TTCTGTCCATTTCCAGTAGCGGCTAGTTGGAAAATTTGTTGTAACATGTAACACAGGCTGTC  
 CACATTCTACTCCAGAGAGAAAGTTGG  
 TAAGTAGTGGGGGCAAAGATAGAGACCCCAATAGCTATCAATTCACTTTGTGACAATCAA  
 GATTTGAGAAAAAAGATCAAACTTTAC  
 CAACTTAGATAGCTCCATAATCAACTGTAGGTACAATTCTTTAGTGAAATTGCGGCGTTCAT  
 CTTCTGGGGACGAAGAGTAAGTAGACAA  
 TCAATTGTCTTGTAGAACTTGGGCTTTACCATTTCCCTAGGACATAAGCTCTTGATCGAAGC  
 TTGAAGTTTAATTTTAGTGGCACTGGT  
 AATG

**Seqüência reversa**

TTTTTTTTTTTTTTTAGCCAAAATGCATACAAAAACTGATTCAGAAGATACGAGCTTGGCTCC  
 TTCGTCCCGGACAATAGAGGGCCGAC  
 GCGTATTACGTTTACAGAGTCCGTACGTGATTCTCACGATGGCGAGAAGACAACGACGTCGT  
 TTCACTCTACTCCTGTTATCAGTCCCAT  
 GGGTTCTCCTCCTCACTCTCACTCATCCGTCGGCCGTCCTCCCGTGATTCTCTCTCCTCCAG  
 ATTCTCCGGCTCCCTCAAGCCTGGATC  
 TCAGAAGATTTTACCCGACGCCGCCGGAGGCGTCGGCGGCCGTCACCACCGCAAAGGGCAG  
 AAGCCCTGGAAGGAATGTGATGTTATTG  
 AGGAAGAAGGACTACTTGAAGATGATAGATCCAGTAAATCTCTTCCACGTCGTTGCTATGTC  
 CTTGCTTTTTGTTGTTGTTTCTTCGTC  
 CTTTTCTCCTTCTTTGCTCTCATCCTTTGGGGTGCTAGTCGACCTC

**Tabela 14****Marcador C2\_At1g74970 COS-II****Experiências de mapeamento****Mapa:** Tomate EXPEN 2000**Iniciador direto (5'&-3'&):**

TCATCATCAACTATCGTGATGCTAAG

**Iniciador reverso (5'&-3'&):**

ACGCTTGCGAGCCTTCTTGAGAC

**Temperatura:** 55°C**Concentração de Mg<sup>+2</sup>:** 1.5 mM**Tamanhos de produtos PCR****LA716:** 1000**LA925:** 1000**Tamanhos da banda digerida (usando AluI)****LA716:** 550**LA925:** 850**Localizações mapeadas**

<b>Mapa</b>	<b>Cromossoma</b>	<b>Equivalência</b>	<b>Confidência</b>
Tomato-EXPEN 2000	4	109,7	I

**Tabela 15**

Marcador CT128

RFLP

**Informação RFLP****Nome:** CT128**Tamanho do inserto:** 700**Vetor:** pBLUESC**Sítio de corte:** EcoR1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

CTTTTTTTTTTTTTCAACACAAACAAAATTCATTATATTGTCAGGTAGCACACTACATCTTTA  
 CACTGTCATCAAACGACCAGAGACTT  
 GAGAACGTTTTAAGAGATTCATTTTCCGGGGACAAAGTTTGTGGCGAAAGCCCAGGCATTGT  
 TGTTTACGGGGTCTGCAAGGTGGTCAGC  
 AAGGTTCTCCAATGGACCCTTCCGGTGACAATAGCTTGAACAAAGAATCCAAACATAGAG  
 AACATAGCAAGTCTACCGTTCTTGATCTC  
 CTTTACCTTGAGCTCAGCAAATGCCTCTGGGTCTTCAGCAAGGCCTAATGGGTCTGAAGCTGC  
 CACCAGGGTAGAGTGGGTCGACAACCTC  
 ACCAAGAGGTCCACCAGCAATACGGTATCCCTCAACAGCTCCCATCAACACAACCTGGCAA  
 GCCCAGATGGCCAAGATGCTTTGTGCATG  
 GACCAAGCTTGGGTTGCCCAAGTAGTCAA

**Seqüência reversa**

CTGGTGATTACGGGTGGGATACCGCTGGACTTTCAGCAGACCCTGAACTTTTGCCAAGAAC  
 CGTGAACCTGAGGTGATCCACTGCAGAT  
 GGGCTATGCTTGGTGCTCTTGATGTGTCTTCCCTGAGCTCTTGGCCCGTAATGGTGTCAAGT  
 TCGGTGAGGCTGTGTGGTTCAAGGCCG  
 GATCCAGATCTTCAGTGAAGGTGGACTTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGCA  
 CAAAGCATCTTGGCCATCTGGGCTTGCC  
 AAGTTGTGTTGATGGGAGCTGTTGAGGGATACCGTATTGCTGGTGGGACCTCTTGGTGAGGT  
 TGTCGACCCACTCTACCCTGGTGGCAGC  
 TTCGACCCATTAGGCCTTGCTGAAGACCCAGAGGCATTTGCTGAGCTCAAGGTAAAGGAGAT  
 CAAGAACGGTAGACTTGCTATGTTCTCT  
 ATGTTTGGATTCTTTGTTCAAGCTATTGTCACCGGAAAGGGTCCA

**Tabela 16**

Marcador TG599 RFLP

**Informação RFLP****Nome:** TG599**Tamanho do inserto:** 700**Vetor:** pGEM4Z**Sítio de corte:** PST1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

TGCTTTGAGACAGATGTCTCTCATTAAGTGAAGCTTTCTTCTAGTTGGCTAGCATATTC  
 ATTTTCAGCATATAATCTGTATCATGA  
 ACAAATGCGACAGTATTGAATTTTTATTGTTGAATAGTCTTTTTATTATCCCCGAAGTTGA  
 GGGTGGAACTTACATTTTCTGTTGATC  
 CTTGCTTGCTGTTTTTGTAACAAAAAAGCGTCACCCATTATTTTTCTTTTATTCTTTCTAGGT  
 TGGGACTAAGATTTTTTGAATGAGA  
 AAGGTATTCGCTACCTTGAGGGCTGTGGTTGAAGTGATGGAGTATCTGAGCAAAGATGCAGC  
 TCCTGATGGTGTGGGAAGGCTTATAAAG  
 GAGGAGGGAGTATTTCTTTTCATTTCTTTGTATTTCCGTGTGTGTATAGTCCGGAAGTGGTTC  
 CCTACTTATGAATTCTTTTCATGGTTG  
 GTCAATTGAGAAGGATCAAGAAATCTGATGCTACTTTATCATGGGAAGT

**Seqüência reversa**

GCTTGCATGCCTGCAGAGTGGTCATACAATAAAAAGGTAAAAATCAACATTCTTACCTCTGG  
 AAAGAAACCAATAGCATTGGTCAATGATG  
 CTGCCTCTAGAGGAACAATATTGTATGGTGCAAGTTCCCCTGATAAAGTAGCATCAGATTTTC  
 TTGATCCTTCTCAACTGACCAAACCATG  
 AAAGAATTCATAAGTAGGGAACCAGTTCGGACTATACACACACGGAAATACAAAGAAAT  
 GAAAGGAAATACTACCTCCTCCTTTATAAG  
 CCTTCCCACACCATCAGGAGCTGCATCTTTGCTCAGATACTCCATCACTTCAACCACAGCCC  
 TCAAGGTAGCGAATACCTTTCTCATTTTC  
 AAAAAATCTTAGTCCCAACCTAGAAAGAATAAAAAGAAAAATAATGGGTGACGCTTTTTTGT  
 TTACAAAAACAGCAAGCAAGGATCAACAG  
 AAAATCTAAGTCCACCCTCAACTTCGGGGATAATAAAAAGACTATTCAACAATAAAAATT  
 CAATACTGTCGCAA

**Tabela 17**

Marcador TG10 RFLP

**Informação RFLP****Nome:** TG10**Tamanho do inserto:** 900**Vetor:** pUC**Sítio de corte:** EcoR1/HindIII**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

AACTCTGCTCTGCCAATAGTAGTCAGGCAGATCAAGATGCTCAAAATTTTCTATTTGAATTG  
 GAAGCATCAAGATGGTTCTTAGCATTTA  
 TTTTAGAAAGACTAACCATATTATCAAATAACCAGACTGAGACGCACACAAAAGTTTCCCTC  
 TATTATTTTATAATGATGTGAAGATGC  
 TACATAATGAGTACACTTTGCCTTACTTTACTGCAGATGGACCTACCAGGCCCAAACGGACA  
 TG TAGCTATGACAGAAGAGCAACCGCTA  
 TGAATGTCTCAAACCTGTTGGCCTAGGCGATCAGCACAGATGATGAATCTGGAAGTACATTCC  
 AAGAAGGAAAGCTGGAGCGTGGGAACTA  
 ACCAGATGCAGGGGATGAATCCACACCTTTTCAGTTGATCATCTGAAGGGAAAACCTAAGAAT  
 TTTTCATGAGAAAATGACTGGCTATTTTCA  
 ACTTTG

**Seqüência reversa**

TTCAATGCATTAAAGCTCAAAAAACAAAGCTGTAGGAAGGAGCATATTAGTAGCCTAACTC  
 TGCTCTGCCAATAATAGTTAAGCAGATC  
 AAGATGCTCAAAATTTTCTAATTGAATTGTTAGCATCAAGATGCTTCTTAGCATTTATTTTAG  
 AAAGATTAACCATATTATCAAATAACC  
 AGACAGAGACGCACACAAAAGTTTCAATCTATTATTTTATAATGATGTGAAAATGCTACAT  
 AATGAGTACACTTTCCCTTACTTTACTG  
 CAGATGGACCTACCAGGCCCAAACGGTCATGTAGTTATGACAGAAGAACAACAGTATGAAT  
 TTCTCAAACCTGTTGGCCAAGGTGATCAGC  
 AAAGATTATGAATTTGGAAGTACATTCCAAGAGGAAAGCTGGAGCATCGTAACTAACCAGA  
 TGCAGGGGATGAATCCACACCTTTTCAGTT  
 GATCATCTGAAGGCCAAAACCTAAGAATTTTCATGAGAAAATACTGGTTATTTTCAACTTTGTT  
 GGCCAGACGAGGAGTCCAATGGGATAGA  
 AGGACTAACTCAATGACGTATG

**Tabela 18**

Marcador TM2a            TM

**TM Information****Nome:** TM2A**Old COS ID:** T0899**Seqüência**

CNAGCTCGANNNACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGC  
 GGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGCTCCTCC  
 ATTGAAAAGGGAATCAAGTTTGCCAAAGAAAATAAAAAACAAAATTAT  
 GGTCTAGTTTTCTATAGTGACAGTTTTGGATCTTTTTGGGTCAATTGTTT  
 TTGTATCCTTTGCAAGTTTCTTGCAGCCGGAGGCTTAGATTTAGCTCTTT  
 TGATATTATACCCAACATTTCTACAAAATAATGTATGGCAAAGCTGGGGGC  
 CTATCCCATTGTCCTTAGTGTGGAGGTGTTATTCTCACATGAATCGTTTT  
 CCAATTATGGTTAGTAGCAGACAATTGATGCAAAAATGAAGAAATGTTTCAT  
 GACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Localizações mapeadas**

<b>Mapa</b>	<b>Cromossoma</b>	<b>Equivalência</b>	<b>Confidência</b>
Tomate-EXPEN 2000 (TM2A)	9	50,5	1

**Tabela 19**

Marcador TG551 RFLP

**Informação RFLP****Nome:** TG551**Tamanho do inserto:** 950**Vetor:** pGEM4Z**Sítio de corte:** PST1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

AATGAAGTTCAGTTGATAAGCTAAATGGTGGAAATACTAATTTTAATTGACAGTAACTTTGC  
 ATTTCAAGGTCCATACCAAACATTTGC  
 TAACACCAGTTGCTTTGTCAACGAAAACCTTGGCACTCAAAACCCTACCAAAGGCTGAAAT  
 GCATTTGCAAGCTCTTGATCACCAAATT  
 CTTGAGGAATATGGTAAATAAATAGATTAGCACCAGGTGGACCTGTAAACAGCAAATCGT  
 TTTTGATAAGTACAGGTTTATTTCTACAT  
 GTTCAACTACCACTGCCAAGTACACTAGTTCAAGTGACATCTCCACCACTTAATTGCATAAA  
 GCTTTACCAACGACAAATATAACAACT  
 TGTGCAAGTAATTTGAGTTCCTGTCTATACAGTCCAGAATCTCCATATGCTGCTCATCTCACA  
 ATGTTGGTTAAGGAAATTTGTCAAGTA  
 AAGTTCAA

**Seqüência reversa**

CATCTTCAAGTGTCAGCTCAAGTACAGGGGGTCAGGTTGAAGGTTGTTGAACATTTATTTTG  
 TGACCTTTTTAGCTCTAGAATTTCTGTA  
 GCTAATCAAGTACAGTCCCATAACCTAGGGGCTGTTAGGGTTTTCTGCTGAATGAGGCTGCT  
 TGTCTTTATTTTGGTTAATTATTTCTG  
 GAAATTGTTCTCGTCATAGAGAATAGAAGTAGAAGAAGAAGATAGTATAATCTATTA  
 TATTTGTTTTTTACTTAATTTATAAAGAT  
 TCCATAAATGCATGTGATCTTTGATCAATGATATCTTATACAAGTGTATCACTAGAATCTATT  
 ATATTTGGATTTACTTATTTTATATAG  
 GATTCATAAACGCATGTGATC

**Tabela 20**

Marcador T1405            COS

**Informação COS**

**Nome:** T1405

**Categoria MIPS:** 1.05.01

**Informação EST**

T1405 foi desenvolvido a partir do EST traço TPTAR86TH.

**Ortologia de Arabidopsis**

**Em pareamento:** T1405 parecia melhor contra a Arabidopsis BAC AC009243.3.

**Em posição:** 1.1490000

**Em identidades:** 0,677

**Acertos de proteínas de Banco de Genes**

**Melhor acerto de proteínas de GenBank:** AAF17692.1

**Valor de E:** 1.5e-67

**Identidades:** 0.677

**Descrição**

"similar a beta-1,4-xilosidase dbj|BAA24107[Arabidopsis thaliana]"

**Localizações mapeadas**

<b>Mapa</b>	<b>Cromossoma</b>	<b>Equivalência</b>
Tomato-EXPEN 2000	4	77,00

**Tabela 21**

Marcador CT173 RFLP

**Informação RFLP****Nome:** CT173**Tamanho do inserto:** 400**Vetor:** pBLUESC**Sítio de corte:** EcoR1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

```

TTTTTTTTTTTAAAAATTCAAACCTCCAATTATTTGCAGTATAAAACTACAGATACAAATCCCA
GTACATGGTTTGAGGCACGATAATAAG
GTGCTGATGAAATCCAAGACATGAGTTCACAATACATTACTGACCAATATATTTACAAAGAT
TAGGGTAATGGCAGTAAAATCGCTGATT
ACAGACAACATTCTTGGGATATATTTTCATCTTAAAGATTAGGATTAGTAGTATGTGTGGCAG
TCACAGTAGAGACCATGGCATCAACTCC
GCAGATATTGTGACCCCTGCAGATCTTGTAATATCCGTGTTCTCCCAAGTCTTTC
CCCAA

```

**Seqüência reversa**

```

TTGGGGAAAGACTTGGGGGAGAACACGGATATTACAAGATCTGCAGGGGTCACAATATCTGC
GGAGTTGATGCCATGGTCTCTACTGTGAC
TGCCACACATACTACTAATCCTAATCTTTAAGATGAAATATATCCCAAGAATGTTGTCTGTA
ATCAGCGATTTTACTGCCATTACCCTAA
TCTTTGTAAATATATTGGTCAGTAATGTATTGTGAACTCATGTCTTGGATTTTCATCAGCACCT
TATTATCGTGCCTCAAACCATGTACTG
GGATTTGTATCTGTAGTTTTATACTGCAAATAATTGGAGTTTGAATTTTTAAAAAA
AAAAA

```

Tomato-EXPEN 2000 (S. lycopersicum LA925 x S. pennellii LA716 type F2.2000)

**Tabela 22**

Marcador TG254 RFLP

**Informação RFLP**

Nome: TG254

Tamanho do inserto: 2200

Vetor: pGEM4Z

Sítio de corte: PST1

Resistência a droga: AMP

**Seqüência direta**

CTAGTTGGATTGAAACAATTGGGAATATAGTGTAGGAAGACTTCGGGGCAATTATCTGCTTT  
 CTTCTATATCAAACCTGGGTCTATTGAAG  
 AATTACAAACTGGACCTTAAATCTTTGCCAGTTTTGTAAAATTGATAAACTTTTGATATTT  
 TATTATGGAAATTCAAAATATATCTTA  
 ATAGTAGCTTGTTAATTTATTTCAAGAGACCCTTTTCATTGTTTCATAGTTCATTATCATCCCCT  
 TATCAGTAGTGCACCAAGGGTGTGAC  
 CTAGTGGTCAATTAAGTATGAATCATGAGTCTTAGACAGAAACACTAGGTGATTTTCTTCCA  
 TGTGTCCTAGCCTCTTAGGCTTGGTGA  
 TAGAGGAGGTATCCTGTCTTTCCCCTTTCCAGAAATTCATAGCATTATTTTCTGTTCTTTATTG  
 ATAAATTATTCATTAGAACAGTTATT  
 AGAAATGTGGAACCTGGTTGAGGTAGGCG

**Seqüência reversa**

CAGAACAGAGAACATGTAAAGTTGTTCAACTAATGAGCATATTTAGAAAACTTAGTGGCT  
 ATCAATAGTTGGCAATATGAAAATAAGA  
 TAGTGTGGTCACCTGTTGATCAATTTCTTCTTCAATAGGCATCTTGTCAGCTTCCTCTTGTA  
 CAAGGCTTTCATTTGTGACTTGAGAAT  
 ATATCCAGGAGGAAGTGCATGCCTGTAATGGCATTCTTTACCATTGGACAGGCCAGAACC  
 AACCGTACTGCTTTTTCTCCACAGCATC  
 CAAAAAGAATTTACATACCTGCATATAAACCAATCATAAGCTTGATTTATGAAACGAGCA  
 CTGCATTATGTTTGGCAATATTTGACTG  
 GAGGAGGAGTTTTAAAGGGGGAAATTAAGACTATAGACACATACACTAAATATGCATAAAA  
 CGCCAAAAGTACCCTGGTTTCCTATCCAG  
 TTAAGGCAACAGTAGCAGAAAATGAGTGTGTAATGAGTCAAT

Tomato-EXHIR 1997 (*S. lycopersicum* TA209 x *S. habrochaites* LA1777  
 type BC1, 1997)

**Tabela 23**

Marcador TG223 RFLP

**Informação RFLP****Nome:** TG223**Tamanho do inserto:** 790**Vetor:** pGEM4Z**Sítio de corte:** PST1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

TATTCAAGAAAATATTGTGTAGTGTTCTCCAATATTCAACTATTTAAGTTCAATGGATCTAGA  
CACACAATATTATTAATTCTCGTCGCC  
GATGGGATGGTTGAGTGATTGAAGCATAGGAATAACATCCTGGAGATTCTAGGTTTGGACTC  
CAGTTTGAACATAAGTGTGAGCCCATCT  
GCTTTATCTTACAAGTTCAATTCAAACCTTGTGTGAGTGGGCCATAGTAGATCCATGCAAAAT  
AGTGGTTATGACGCTATGGTGAGTTCAT  
GAGAAGAATTATTGTTTCCTTAGGAACAGTGACAGGAAATTCAATGGTCAAATAACATCAAG  
AAGACTTTTGGATTAGTTACTGAGTGAT  
GTTTCAAGAGGGACTAAATATCTAACATGCCCCCTCAAGCTCCAGATGGTAAAGCAACTTG  
AGTTTGAGTTACTAGAATTTAGTAACAT  
AAAAAGGTTTTCCAT

**Seqüência reversa**

TTTCCACACACACAAAAAAACATCTTGAACACACTGTAATCCCCCTCTTCATCAAATTCTCC  
TGTGTCAACACAACCTCCTTAGCCAGT  
AACCACACAACCTCCCTCTTCTGAACATTACAAAGTCGCTGATCCAGAAAGTCTTGTCTTGA  
TGCTATTTGACCATTGAATTTCTGTC  
ACTATCCAACATGAATAGTGTGTTGTAGGGAATAAATTGAAATCAGATTACAAGGATCCAAAT  
ATCCATCCCCAACAATGTACTGTTTATG  
CCCGAAGGTGAGGATAAAAAGATGGAAAACCTTTTTATGTTACTAAATTCTAGTAACTCAA  
CTCAAGTTGCTTACCATCTGGAGCTTG  
AGGGGGCATGTTAGATATTTAGTCCCTCTTCTG

Tomato-EXHIR 1997 (*S. lycopersicum* TA209 x *S. habrochaites* LA1777  
type BC1, 1997)

**Tabela 24**

Marcador TG47                    RFLP

**Informação RFLP****Nome:** TG47**Tamanho do inserto:** 1900**Vetor:** pUC**Sítio de corte:** EcoR1/BamH1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

TGCAGTTGAATTCGTCTTCTTAACACTATTCTCTTATGCTGTGCATCAAGACAACCACCCTCA  
 TTGGGCGGTCATTGCTTCTTCAGGCAT  
 GACCCTACAGTTAGTACATTTGGTTTTACCAAATCTTCTTCTAAGGATAAATCTATTTGACTA  
 TGGTTCACCTCTCTAAATCATAAGCTGA  
 AACAAATCAACATACCCCGTGTAATCATAAGCTAAAACAACTCTAGAATAGCCTTACCT  
 CATCATTCCTAGGACCATAATTATATCT  
 ATACTTAGTCAAAATCATATAAAATTTACCTACAAGACCATTAGATCTCACCTGATTAAG  
 ATTTGTTGGTTACTCGTAATCCCTTGAA  
 CTAAGGTGTAACATCTTAACCCCTCCTTTTGAGTATTTATACCATCATATTTTGAAACTTCTC  
 GTAGGTTTCATATGTTTCTTTTGGTACT  
 TGTTAGTATAGCTTGGAGTGGGACCCAAGGGGCTCCAGTGAGTTCTAGACAAGAAAAACGA  
 GATTTGAACATTGCAGATTTTATGTTTTT  
 TGGT

**Seqüência reversa**

CTTTGTTTGCTTGCAAGACAGAGATTTATACACGCTAATGCTATCTTTTTTGTGTCATTAACAG  
 CTAGTTTGATTTGCTTGGTTAATACAG  
 TTATGGTAGATAGAGAAGATAGTTTCAAAATAGAAAGAATGATGTAGACAGCATTAAATGAA  
 TCTTTCTCCTTACAATTGTACCTTTGACA  
 AGGAATCCACCTTTTATAGGTAGTTTGGTGAGTTTGATGGAAGATTGTGGTTGAATCTGGTT  
 GAGTCATAGACACTACTTGTACATTCTT  
 TTATGACACTGACTTGATGTTGTAAGAGTGAAATGTATAGACTTATCAACAAATAACAGAGT  
 AGAAATAAAAGTAGGTTGAAGATAGCTT  
 CTTGTTTGGTTCTAACTTGCTCCTTTGTTGACTGATATGATAACATTGTGTCAATATAAGATG  
 ATTCAAAATGTTGCCTGAATTTTTATG  
 AAATTGATATTCATCGTCCAGTTTAGAGAGTTCT

Tomato-EXPEN 2000 (*S. lycopersicum* LA925 x *S. pennellii* LA716 type  
 F2.2000)

**Tabela 25**

Marcador TG393 RFLP

**Informação RFLP****Nome:** TG393**Tamanho do inserto:** 1200**Vetor:** pGEM4Z**Sítio de corte:** PST1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

ACTGACTAAGCTGCTGGATTTGATTAGCCGAAGGAATTTACTTTTGGTTACATCTTGCTCCATCAC  
 CTTTGTCTTTATCTAGGTCAATCT  
 TGTACCATAGATGCAAATAACACTATGAACAGATTAACAATGTCTTGAGGAGGATTAGGCTGTC  
 AACAGCCTGCATAATAACAGGAACAA  
 CATTGGCGTTTGTGTTGCATCAGTTACTGTGACTCTGATTAAAGGAGAAAATGTGGCATCCTCTGC  
 TTATACTGTCAGTGTGTATACTTGT  
 CAGGTTAAGTTGGTTGCTATAATCTTTAATAATTCTTGATTTTGTGGTTGTTTCTGAAGTAAATTG  
 ATATGTGGGCCTTTGAGCTGGAGG  
 AGATGGTACTTTAGCTATTCACTAACAATCGTTTACCTTAAAAATGTTATTCTGTA  
 AGTATCTAACCAAATTCTGATCAC

**Seqüência reversa**

TGCAGACACCAAAGAAACAATTGGTTATATAAAAAACAATCCACAATCATTCTCTATAGAAGTC  
 ACGCAAAGACACTACATAACCTCCAA  
 GTGCAATGAAGAGGATGCAGAATAAGAAGCTCAGAACTTCCAAAAGAAAAGGTGACTGAAAA  
 TAAGTTTGCTGAAAAGGTACAAGGCAAG  
 TTCTAATTCTCAACTAGCTTTAGGTATACACTAAAGAAAAGGAAAATAAATTCCAAACAGAAGT  
 TTCCATCCTACCTAGTACATAAAAGA  
 AAAAGGTA AAAAGGAACATATGGAAGTGTCCCTGTTACCTAACTTTTGGTGATAAACAGTA  
 ATCATGATTACCCCCACCTCACACAC  
 CACCACTACAGCACAAAAATTAGAAATGTTGTATGGACCATGATCAACCAGCCAAGAATCCCA  
 GAAGGAGAATAAAGGAGTTCTCTTAAT  
 CACAAGAGGAGAATATCATCTACT

Tomato-EXPEN 2000 (S. lycopersicum LA925 x S. pennellii LA716 type  
 F2.2000)

**Tabela 26**

Marcador CT19            RFLP

**Informação RFLP****Nome:** CT19**Tamanho do inserto:** 300**Vetor:** pCR1000**Sítio de corte:** HindIII/EcoR1**Resistência a droga:** KN**Seqüência direta****Seqüência reversa**

```
GCCCCAAAACCTCCTGCTGGATTTTACTGGATCTCCACTTGCTGCGGACATTGCTTGCCTCCGA
CAATCATCTTCCCAACTTCTCCTTTT
TGTCTTGAAATTAATCCCTGTACCCATTGCTGCTTCTAAATGACCTCCTGCATCCCGGCGGA
TCCACTAGGTCTAAAGCTGCCGCCCC
GC
```

Tomato-EXPEN 2000 (S. lycopersicum LA925 x S. pennellii LA716 type F2.2000)

**Tabela 27**

Marcador TG68                      RFLP

**Informação RFLP**

**Nome:** TG68

**Tamanho do inserto:** 1900

**Vetor:** pUC

**Sítio de corte:** EcoR1

**Resistência a droga:** AMP

**Seqüência direta**

GGATTTTGATGAACTTGTATCTGTGCTTCTAGCTCCACCTAGGATGAGTTTGGATTTGTACGA  
 TTAACAAATGTTTGAGCTGAAAGAATT  
 AAATTTGATTACACCTGCCTTTACATATTTTTGTTGCGTAAGGATTTTCTATGAAGAATATAT  
 ATGTATGTATGTGTAAAGGATGCACTA  
 AGCATCTCGCATTTTGATAAAGAAATGAACTTTGGGCTTAACTCAACTCCAAAAGTTAGCTC  
 ATGAAGTGAGGATATCGCGTAAGACCGT  
 ATAAGGAGACCTAGAACCCATCCCACAACAATGTGTGACTCCAACACATTCACGCAAGTTCT  
 GGGGAAGGGTTGCACTCGTAAGGGTTGT  
 GATGTAGGCAGCCATAATTGTGTGTACCCATTCGTTAGAAAACACTACTGTGCAAGTGGAGT  
 TAAATTGTATCTTTTTTGGTTTTGTGTG  
 AGTTGTTCAATCCCCTTGACATGAAAAAAGAAGCAAAATTCAAGTATAATGGTAA  
 AAGGGGATTCAAAAT

**Seqüência reversa**

TTGGGTCAGCCATAGTACTTCGTGATATATCTCTGACAGAAGATATCTGCTCAAGACCATGA  
 ACAATACGGAGACATAAGAAGGAAAGAA  
 GTTCAGTGCAGCACAAAATTTAATAAGTTAACTTAAAGGGGGATAAGAGGCCAAAACCAAT  
 ATAAAAGTTTGACAGACAAAATTTTAATT  
 AGTATCAAAGAGTGAATGATGCTAAAAGAAGAGATGCTTAAATATCTGATACTATAAAGTA  
 AGCCATGACTAATTGGTAATTATGAATGG  
 CATATGATACGACTATCAGTTTTGACTGTTGTCTACAATAATGATTTTCAGAAACATATGATAT  
 ATTTCAAATAGAATTGAATAACAACAC  
 TTGTTCAAATACCTAGCTCTCGGAGGCAGATCCAGAATTTTAGAAAGTGGGTGCAGTAAATC  
 ACAAGAGTACACCTCTGCTAGAATGGGT  
 GTGTAATGTAACAAAACCTGTTTTGATATGCATAT

Tomato-EXPEN 2000 (S. lycopersicum LA925 x S. pennellii LA716 type  
 F2.2000)

**Tabela 28**

Marcador TG565 RFLP

**Informação RFLP**

Nome: TG565

Tamanho do inserto: 1700

Vetor: pGEM4Z

Sítio de corte: PST1

Resistência a droga: AMP

**Seqüência direta**

ACTAGCATCTCTTGGAGGATGCTGAGGTGTCAAGTGGTGTGACCACTCGTTACCACTGATT  
 CACAGCTGGTGTCTTTTCGAAGCAAGCTT  
 CGTCTGCAAAACAAGAATCACACTTTAATCCTCTGTACCTAAAAACAATAGTTGTTTGATG  
 TAATGAAAGAAGAATTTTCACTTCAATG  
 ATGGAAAGAAAATCTTACAGTTTGAGTTTGCTTGCAGAAAGTAGCCATTTTCATACACCAGTT  
 GAGAACTTGCTTCTGCAATCTATCATT  
 CTCTTCCATTAATAGCTTGTTCATTGCTGACAGCTTCCATTACACCCTGAAGCCTTGATGA  
 CTCTTCCCTCTGTTTTCCCTACATCT  
 ATACAACCTCAAAGAAAACAATCAATTATACTTCAAATTAATTGGGGTTCGCTAAAAATGAATCC  
 TTTAGACTAACACATCCCACAAGTCCCT  
 TACCCCTACCTCGCAGAGGTAGAGA

**Seqüência reversa**

TCAGCAAAATGTCACACAGAGAGTACAGTAGTAGAGCACAGTAGAGTAGGGAGAAGTTGCC  
 TCAAAAGAGGAAAAGAAAAGGTAACGAAC  
 CACACATTTGACAGCTCAAACCCTTTACCAATCCAAACAAAAATCATCATTATCCCT  
 CCCTTCTCTCCTTTCTCTATTACTCTCA  
 TTTTCCCAAGTTTCAGGTACCTTTTTTCTAACATAATCCGCCCATAGTGTTTCATCATTCAAG  
 ATCTGTCCTTTTGAGGAGACTTCATTC  
 CTTACTATGGTCTTCTTTTTTTGATGATTTCTTATGTGAGATGTTGAAAAGTGGAAAGAAGTG  
 ATAAAGATAGGAGGTTTGGTTTCTGGG  
 GTTTGTATTTTGGCTTTACAAGGGTTAAAGATTGGATCTTTTTTAGTTTTGGTAGATACCCAT  
 GTCTAATCTTGTTCAGAATTCAAAA  
 GGTGTTACTTTACTGTTTTGCAAGTGGATGACAGAGGAG

Tomato-EXPEN 2000 (*S. lycopersicum* LA925 x *S. pennellii* LA716 type F2.2000)

**Tabela 29**

Marcador TG296 RFLP

**Informação RFLP****Nome:** TG296**Tamanho do inserto:** 1100**Vetor:** pGEM4Z**Sítio de corte:** PST1**Resistência a droga:** AMP**Seqüência direta**

TTAGGTTTTGTGTGGTTCAACGTTTTGGTTTTGATTTTTATGTGTTTTCTTAGTTCCTTGCTT  
 CACCATTTTGATGGTATTTGAGTT  
 TTTGATGTTCTGTCGGCATAAAGTAGTGATTTTTTCAGACAGTTTGGTATTATGGAGTATGTTT  
 CTTTGCTCTTCTAATTTGGATTGGT  
 TCTGATTTGTATATGCTTGTTTTAGTTTTCGATGGTTTTTGAGTTTTTGATGATTCATTGGCACA  
 AAGTAGTGATTTTTCAGACTGTTGGG  
 TTTTGTGGGGTCCCGTGCTTGCTCTTCACTAATTTGGATTGGTCTGATTTGTATATGTTTTA  
 GTTTTGATGGTTTTGAGTTTTGAT  
 GATTCATCGGCACAAAGTAGTGATCTTTCAGACAGTTGGGTTTTGTGGGGTTCACGTGCTTAT  
 TCTTCACTATTCTCGGTTGGTTTGATT  
 TGTAGGTCCGTTTTAGCAT

**Seqüência reversa**

AGAATATAACAAAAAGCAGATAAATCAGTTAATTATGCCTCAATCTCAACAAGTGAATAA  
 CAAATCCTATCAGAAGATATAGTAGACGA  
 TAAACAGTGAAGGTAGAAGCCTAACTCTATGACATTATCTTGAGACCCAAAACACTTCATCA  
 AAGACTCAAAAGAAATAATTTGTTCCACC  
 AAGTACTATTAATAATTATCAAACTAGAAATTCTCAAAATAAAAAATAACAAATCTTATCA  
 GTCACATGGACATTCATTAACATCATG  
 AAGAAGACAACAAGGGAAGGTCAAACTGGACTCCATGGCACATAAGATAATAACAAAAG  
 GTAGTTTAAGGCCTAAAACACTTCAAAAAT  
 AAAATTTATTACACAGATATCAATAATATTATCTGTTCTTCCTTCATTCATGAGGGGCATGCA  
 CAAGAGACAATATACATCATTCTCCT  
 TTTACTTTTTCTTCTGAGGAAGTAAAAGGAGCAGAAAGCAGATAGAAAGA

Tomato-EXPEN 2000 (*S. lycopersicum* LA925 x *S. pennellii* LA716 type  
 F2.2000)

**Tabela 30:** Seqüências de iniciadores, comprimentos de produtos de PCR e enzimas revelando um polimorfismo para marcadores CAPS/SCAR.

Nome do marcador	Cromo-soma	Seq. Do iniciador (5'-3')	Compr. do prod. PCR observado (bp)	Tm de anelamento (°C)	Tipo de marcador	Enzima
TG224	1	GTATACTCAACAGAGCTTCAGAC GTGTAGATACCTGCACTCTCAG	500	55	CAPS	<i>HaeIII</i>
TG59	1	AACTCTACGCTGCACTGCTG CTGAAGCTCACCTTGAGGTG	300	55	CAPS	<i>HpaII</i>
TG460	1	CGAAATGTGACTATTCCAGAG GTAATTTGCACTTCTTGCCCT	400	55	CAPS	<i>AluI</i>
TG145	2	TTCATTGCTGGACAGGCAGTC TGTCATCAAACGACCAGAGAC	850	55	CAPS	<i>HpyCH4I V</i>
C2_At4g3 0930	2	ATCATACCTTCTCTCCAACCC TCGCCATTGCTCACTTTAAACTG	700	55	CAPS	<i>BseDI</i>
C2_At5g6 4670	2	TGATAAAATGCTGGGAAGATTGACTC ATCAACCTGGCTCCATCTTCTATTTG	200	55	SCAR	
TG337	2	TCCACAGTATTGCTTCTTGTTTC GGGTGTGTCTGTTTGACAGC	450	57	CAPS	<i>MnlI</i>
TG91	2	TGCAGAGCTGTAATATTTAGAC CGGTCTCAGTTGCAACTCAA	400	55	CAPS	<i>ApoI</i>
TG40	3	GCGAGCTCGAATTCAATTCCAAC CGGGATTTTAGTTTTTCCGATCC	450	55	CAPS	<i>HpyCH4I V</i>
TG56	3	TTTGTACCATGATTGTCCGATC GGCATTCACTTCAACATGC	380	55	CAPS	<i>HpaIII</i>
TG585	3	TGGAAAGCCAGACACACAGA CAGGGGTATCAGTAGGCAGTG	580	55	CAPS	<i>HinfI</i>
T1388	3	GCGATTTGGCTATCTGGGTA AACCGAAAGGCTTTTCCAAG	1000	55	CAPS	<i>HinII</i>
T0753	3	TGGTGCAACAATCCCGAGC AGTTATCATAATGGCTAGCTTG	1500	55	SCAR	
C2_At5g6 0160	3	ACACAATGCTAATCAACGTTATGC TCATCCACCGCCACATTTTC	500	55	CAPS	<i>HinIII</i>
TG599	3	GCATGCCCTGCAGAGTGGTC ATTCGCTACCTTGAGGGCTG	350	65	CAPS	<i>DdeI</i>
C2_At5g4 9970	3	AATTGGCAGGCTTGAGTGTTC TCCCACCATTTGTACCAGGACCAC	850	55	CAPS	<i>HpyCH4I V</i>
TG42	3	TTCTCACTGCTTGACCAGC TAGAACTTGGCATCCCTTGAAG	560	55	CAPS	<i>MnlI</i>
TG134	3	CTACACAATTGTCACAGAAGTG GAGATCATTGGTATACAGCTG	500	55	SCAR	
C2_At1g6 1620	3	ATGCATTCTAGAATGCCTTTTGTG TCCCTGGCTTTCTGCAGCATC	1350	5	CAPS	<i>HaeIII</i>
TG549	3	ATGGAGAGAAGCTGGAACAC TTCTTAGAGCCCACCAGCAC	400	55	SCAR	<i>MseI</i>
CT229	4	ATGGGCTGGGATCGTAGTAAA AAGCTTGCATTCCCATAAACA	336	55	CAPS	<i>MwoI</i>
T1068	4	CAAAGCAATGGGCAATGGT ACACAGCAGTTTCAGTAGGAC	304	55	CAPS	<i>HincII</i>
TG272	4	GATTTTGCCCCCTCTACCA ACATCTTTTCCCTCCCTCTGC	352	55	CAPS	<i>MnlI</i>
TG264	4	GGAACAGGTCAAGACAGCAT TGGCTAACTGACGAAGACGA	520	55	CAPS	<i>HaeII</i>
TG62	4	CATGCCTAGTTGCAGTGTC TTCAGCAGCAAGCAAAGATG	410	63	CAPS	<i>DdeI</i>
T1405	4	CACCAACAAGCTAGCCCTTGA AAGCAATTCCTCCAGCTTCA	535	55	CAPS	<i>BsaII</i>
CT50	4	GACGGCGTATTACGTTTCA CTAGCACCCCAAAGGATGAG	390	55	CAPS	<i>DdeI</i>
TG441	5	TGTCAGCATAGGCTTTTCCA CGGTCCGGAAAAATGACA	550	55	CAPS	<i>RsaI</i>
CD31	5	ATCTCGGATCATGTTGAC ATFFCCAFAGAAATTCAAA	501	55	CAPS	<i>HinfI</i>
TG318	5	CAAGCCATAGAAATGCGGTA TGCTCTCTCTGTGATGGAAGC	450	55	SCAR	
TG358	5	CAACTTTCCAGGTTTCAATTTCTC ACACCTACATGCTACTAAGGGGTC	700	55	CAPS	<i>DdeI</i>
TG60	5	TTGGCTGAAGTGAAGAAAAGTA AAGGGCATTGTAATATCTGTCC	400	55	CAPS	<i>HpyCH4I V</i>
CT138	5	ACCAGCCCCGGAAGATTTTA GCGGTCAACTTCAGCAACTAT	364	55	CAPS	<i>RsaI</i>
TG183	7	CTACTTGTCTGCCAAGGATTAC CGTGCCGTTCAAGAAGAGTG	1200	55	SCAR	

CT114	7	ATTGAAGAATGGCGGTGAAG ATGCCAACTTCTTGCAAAC	1125	55	CAPS	<i>DdeI</i>
TG254	9	TTGGGAATATAGTGTAGGAAG CTGGAAAGGGGAAAGAC	380	55	CAPS	<i>FokI</i>
TG223	9	CAAGAAAATATTGTGTAGTGTCTCCA TCCCCCTTTCATCAAATTC	700	55	CAPS	<i>MnlI</i>
TG10	9	ATGATATCCACACCCTGGA ATGCCTCGAAATTCAAATGC	587	55	CAPS	<i>AluI</i>
Tm2a	9	AGCGTCACTCCATACTTGAATAA AGCGTCACTCAAAATGTACCCAAA	1600	53	CAPS	<i>AccI</i>
U38666	9	AGCTGCCGTGCCTGTATCA ACTCATGTTCACGCCACTTTCTTA	400	55	CAPS	<i>HinfI</i>
CT203	10	TAGAATATGGGAAGCGAAATG GAGAGGAAGCGTAATAGG	400	55	CAPS	<i>HaeIII</i>
CT240	10	ATCCCAAGTACCCTCGATTAGT AGCCTTCTTGTGCCATCAG	850	55	CAPS	<i>HaeIII</i>
TG296	12	TGTTCTGTCCGCATAAAAGT TGCTAAAACGGACTACAA	373	55	CAPS	<i>HpyCH4I</i> V

**Tabela 31:** Tabela de tamanho de alelos encontrados em polimorfismos de Tabela 30, quando cortados com a(s) enzima(s) indicada(s).

Nome do Marcador	Crom.	Compr. do prod. PCR observ.	Alelos com capacidade de discriminação (tamanho estimado digerido [bp])	
			SL homozigoto*	SH homozigoto*
<u>CT229</u>	<u>4</u>	<u>400</u>	<u>300 + 100</u>	<u>400</u>
<u>T1068</u>	<u>4</u>		<u>130 + 670</u>	<u>900</u>
<u>TG272</u>	<u>4</u>		<u>200</u>	<u>250</u>
<u>TG264</u>	<u>4</u>		<u>450</u>	<u>160 + 280</u>
<u>TG62</u>	<u>4</u>		<u>90 + 350</u>	<u>90 + 130 + 210</u>
<u>T1405</u>	<u>4</u>		<u>180 + 370</u>	<u>100 + 180 + 310</u>
<u>CT50</u>	<u>4</u>		<u>190 + 210</u>	<u>400 + 410</u>
<u>TG254</u>	<u>9</u>		<u>350</u>	<u>300</u>
<u>TG223</u>	<u>9</u>		<u>200 + 360</u>	<u>250 + 260</u>
<u>TG10</u>	<u>9</u>		<u>220 + 367</u>	<u>520</u>
<u>TM2a</u>	<u>9</u>	<u>1050</u>	<u>425 + 625</u>	<u>1050</u>
<u>U38666</u>	<u>9</u>		<u>180 + 400</u>	<u>200 + 250</u>
<u>TG296</u>	<u>12</u>		<u>340</u>	<u>290</u>

\* SL = *Solanum lycopersicum*. SH = *Solanum habrochaites*. Em plantas heterozigotas produtos digeridos tanto de SL como SH são encontrados. Tanto em Tabela 30 como Tabela 31 o comprimento observado de produto de PCR é estimado a partir de bandas em gel de agarose.

## Referências

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore **DD**, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1995). "Current Protocols in Molecular Biology", 4th edition, John Wiley and Sons Inc., New York, N.Y.
- 5 Bai **YL**, Huang CC, van der Hulst R, Meijer Dekens F, Bonnema G, Lindhout P (2003) QTLs for tomato powdery mildew resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes. *Mol. plant microbe interactions* 16:169-176.
- Benito EP, ten **Have** A, van 't Klooster **JW**, van Kan **JAL** (1998) Fungal and  
 10 plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:207-220.
- Bernacchi D, Tanksley SD (1997) **An** interspecific backcross of *Lycopersicon lycopersicum* x *L. hirsutum*: Linkage analysis and a QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics* 147:861-877.
- 15 Brugmans B, van der Hulst RGM, Visser RGF, Lindhout P, **van** Eck HJ (2003) A new and versatile method for the successful conversion of AFLP (TM) markers into simple single locus markers. *Nucleic acids research* 31: Nil-9-NL17
- Canady MA, Meglic V, Chetelat RT (2005) A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivated tomato. *Genome* 48: 685-697
- 20 Christou P, Murphy JE, and Swain WF (1987) Stable transformation of soybean by eletroporação and root formation fkom transformed callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3962-3966.
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for Quantitative  
 25 trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Deshayes A, Herrera-Estrella L, Caboche **M** (1985) Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. *EMBO J.* 4:2731-2737.
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992) *Plant.*

Cell 4:1495-1505.

Dik AJ, Koning G, Kohl J (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:115-122.

- 5 Doganlar S, Frary A, Ku HM and Tanksley SD (2002) Mapping Quantitative Trait Loci in Inbred Backcross Lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589).

Genome 45:1189-1202.

- Draper J, Davey MR, Freeman JP, Cocking EC and Cox BJ (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 23:451-458.

Dunnett CW (1955) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association* 50: 1096-1121.

- 15 Eckstein F (ed) (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach.* Oxford Univ. Press, NY 1991.

Eduardo I, Arus P, Monforte AJ (2005) Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theor Appl Genet* 112: 139-148

- 20 Egashira H, Kuwashima A, Ishiguro H, Pukushima K, Kaya T, Imanishi S (2000) Screening of wild accessions resistant to mofocinzeno (*Botrytis cinerea* Pers.) in *Lycopersicon*. *Acta physiologiae plantarum* 22: 324-326.

Eshed Y, Zamir D (1994) A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *S. lycopersicum*: a tool for fine mapping of genes. *Euphytica*. Dordrecht:

- 25 Kluwer 29 Academic Publishers. 1994 79: 175-179

Eshed Y, Zamir D (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*. Bethesda, Md.: Genetics Society of America. Nov 1995 141: 1147-1162

- Foolad MR, Zhang LP, Khan AA, Nino Liu D, Liln GY (2002) Identification of QTLs for early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using backcross populations of a *Lycopersicon lycopersicum* x *L. hirsutum* cross. *Theor. Appl. Genetics* 104:945-958.
- 5 Frary A, Doganlar S, Frampton A, Fulton T, Uhlig J, Yates H, Tanksley S (2003) Fine mapping of quantitative trait loci for improved fruit characteristics from *Lycopersicon chmielewskii* chromosome 1. *Genome* 46: 235-243
- 10 Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science Washington*. 2000; 289: 85-88.
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR, Zamir D (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* 305: 1786-1789.
- 15 Fridman E, Pleban T, Zamir D (2000) A recombination hotspot delimits a wildspecies quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, D.C.: National Academy of Sciences. Apr 25,2000 97: 4718-4723.
- 20 Fulton T, van der Hoeven R, Eannetta N, Tanksley S (2002). Identification, Analysis and Utilization of a Conserved Ortholog Set (COS) Markers for Comparative Genomics in Higher Plants. *The Plant Cell*14(7): 1457-1467.
- 25 Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R (1990) Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 37, 179-191.
- Grandillo S, Tanksley SD (1996) QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92: 935-951.
- Gruber MY, Crosby WL (1993) Vectors for Plant Transformation. In: Glick

- BR and Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, pp. 89-119.
- Haanstra JPW, Wye C, Verbakel H, Meijer Dekens F, van den Berg P, Odinet P, van Heusden AW, Tanksley S, Lindhout P, Peleman J (1999) An integrated high density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon lycopersicum-x L. pennellii* Fz populations. *Theor. Appl. Genetics* 99: 254-271.
- Hain R, Stabel P, Czernilofsky AP, Steinbliss HH, Herrera-Estrella L, Schell J (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene to plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 199:161-168.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholts D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Jansen RC (1993) Interval Mapping of Multiple Quantitative Trait Loci. *Genetics* 135~205-211.
- Jansen RC (1994) Contrilling the Type I and Type II Errors in Mapping Quantitative Trait Loci. *Genetics* 138:871-881.
- Jeuken MJW, Lindhout P (2004) The development of lettuce backcross inbred lines (BILs) for exploitation of the *Lactuca saligna* (wild lettuce) germplasm. *Appl Genet* 109: 394-401
- Kado C1 (1991) Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 1-32.
- Klein TM, Gradziel T, Fronun ME, Sanford JC (1988). Factors influencing gene delivery into zea mays cells by high velocity microprojectiles. *Biotechnology* 6:559-563.
- Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, and Fitzpatrick- McElligott S (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* 10:286-291.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12:172-175.

- Ku MM, Liu J, Doganlas S, Tanksley SD (2001) Exploitation of Arabidopsis tomato synteny to construct a high-resolution map of the ovate-containing region in tomato chromosome 2. *Genome*. Ottawa, Ontario, Canada: National Research Council of Canada. June 2001 44: 470-475
- 5 Laursen CM, Krzyzek RA, Flick CE, Anderson PC, Spencer TM (1994) Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *Plant Mol Biol*. 24(1):51-61.
- Lin SY, Sasaki T, Yano M (1998) Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross
- 10 inbred lines. *Theor Appl Genet* 96: 997-1003.
- Miki BL, Fobert PF, Charest PJ, Iyer VN (1993) Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants. In: Glick BR and Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, pp. 67-88.
- Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation
- 15 of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports* 8:238-242.
- Monforte AJ, Friedman E, Zamir D, Tanksley SD (2001) Comparison of a set of allelic QTL-NILs for chromosome 4 of tomato: deductions about natural variation and implications for germplasm utilization. *Theor appl genet*. Berlin; Springer Verlag. Mar 2001 102: 572-590
- 20 Monforte AJ, Tanksley SD (2000a) Development of a set of near-isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: A tool for gene mapping and gene discovery. *Genome* 43: 803-813
- Monforte AJ, Tanksley SD (2000b) Fine mapping of a quantitative trait locus
- 25 (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theor appl genet*. Berlin; Springer Verlag. Feb 2000 100: 471-479
- Myburg AA, Remington DL, O' Malley DM, Sederoff RR, Whetten RW

(2001) High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. *Biotechniques* 30: 348-357.

Nesbitt TC, Tanksley SD (2001) fw2.2 directly affects the size of developing tomato fruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution. *Plant Physiol.* 127: 575-583.

Nicot PC, Moretti A, Romiti C, Bardin M, Caranta C, Ferrière H (2002) Differences in susceptibility of pruning wounds and leaves to infection by *Botrytis cinerea* among wild tomato accessions. *TGC Report* 52: 24-26.

Paterson AM (ed.) (1996) *Genome Mapping in Plants*, Academic Press Inc San Diego, CA, USA. Pestsova EG, Borner A, Roder MS (2001) Development of a set of Triticum aestivum-Aegilops tauschii introgression lines. *Hereditas* 135: 139-143.

Phillips RL, Somers DA, Hibberd KA. 1988. Cell tissue culture and in vitro manipulation. In: G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3<sup>rd</sup> ed., p. 345-387. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.

Pierik RLM (1999) *In vitro Culture of Higher Plants*, 4th edition, 360 pages, ISBN: 0-7923-5267-X.

Prins TW, Tudzynski P, von Riedemann A, Tudzynski B, ten Have A, Bansen ME, Tenberge K, van Kan JAL (2000) Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In "Fungal Pathology" (J. Kronstad, editor). Kluwer Academic Publishers, pp.33-64.

Ramsay LD, Jermolovs DE, Bohuon EJR, Arthur AE, Lydiate DJ, Kearsey MJ, Marshall DF (1996) The construction of a substitution library of recombinant backcross lines in *Brassica oleracea* for the precision mapping of quantitative trait loci. *Genome* 39: 558-567

Roupe van der Voort JNAM, van Zandvoort P, van Eck HJ, Folkertsma RT, Hutten RCB, Draaistra J, Gommers FJ, Jacobsen E, Helder J, Bakker J (1997) Use of deletion specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps

from different potato genotypes. *Mol. Gen Genetics* 256: 438-447.

Rousseaux MC, Johes CM, Adams D, Chetelat R, Bennett A, Powell A (2005) QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theor Appl Genet* 111: 1396-1408

5 Sambrook J, and Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY, USA., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Particulate Sci. Technol.* 5:27-37.

10 Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6:299-302.

Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologica Plantarum* 79: 206-209.

Sanford JC, Smith FD, and Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* 217:483-509.

15 Sobir OT, Murata M, and Motoyoshi F (2000) Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the TM-2 locus of the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 64-69.

Steward CN, Via LE (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14: 748-

20 750.

Tanksley SD (1993) Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 27: 205-233

Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:

25 1141-1160.

Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, Zamir D, Eshed Y, Petiard V, Lopez J and Beck-Bunn T (1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92: 213-224.

- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1998) RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Aio/technology* 7: 257-263.
- 5 Tijssen P (1993) Hybridization With Nucleic Acid Probes. Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier.
- Urbasch I (1986) Resistenz verschiedener Kultur- und Wildtomatenpflanzen (*Lycopersicon* spp.) gegenüber *Botrytis cinerea* Pers. *J Phytopathol* 116: 344-351
- 10 Utkhede R, Bogdanoff C, McNevin J (2001) Effects of biological and chemical treatments on *Botrytis* stem canker and fruit yield of tomato under greenhouse conditions. *Can. J. Plant Pathol* 23: 253-259
- Utkhede RS, Mathur S (2002) Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Microbiol.* 48: 550-554
- 15 Van Berloo R (1999) GGT: Software for the display of graphical genomes. *J. Heredity* 90: 328-329
- Van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE (2001) Resistance *QTL* codrmed through development of *QTL-NILs* for barley leaf rust resistance. *Mol. Breeding* 8: 187-195
- 20 Van Heusden AW, Koornneef M, Voorrips RE, Bruggemann W, Pet G, Vrieling van Ginkel R, Chen X, Lindhout P (1999) Three *QTLs* from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis*, *Theor. Appl. Genetics* 99: 1068-1074.
- 25 von Korff M, Wang H, Leon J, Pillen K (2004) Development of candidate introgression lines using an exotic barley accession (*Hordeum vulgare* ssp *spontaneum*) as donor. *Theor Appl Genet* 109: 1736-1745
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and *QTLs*. *J. Heredity* 93: 77-78.

Vos P., Hogers 'R, Bleeker NI, Reijans M, van de Lee T,.Hornes M, Frljkers A, Pot J,.Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a:new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 23: 4407-4414.

5 Wehrhahn C, Allard W (1965) The detection and measurement of the effects of individual genes involved in inheritance of a quantitative character in wheat. *Genetics* 51: 109-119.

Zarnir D (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature reviews genetics* 2: 983-989.

10 Zhang L, Cheng L, Xu N, Zhao M, Li C, Yuan J, and Jia S (1991) Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. *Biotechnology* 9:996-997.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 a) fornecer uma planta de tomate doadora resistente a *Botrytis*, preferivelmente uma planta resistente a *Botrytis* da espécie *S. habrochaites*, mais preferivelmente uma planta resistente a *Botrytis* da linhagem *S. habrochaites* LYC 4/78;

10 b) transferir ácido nucleico de dita planta doadora para uma ou mais plantas de tomate receptoras susceptíveis a *Botrytis*, preferivelmente uma planta da espécie *S. lycopersicum*, em que dita transferência resulta na introdução de material genômico da planta doadora na região correspondente do genoma de dita uma ou mais plantas receptoras;

15 c) selecionar dentre ditas plantas de tomate receptoras uma planta que compreende dentro de seu genoma pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis* derivado de planta de tomate doadora resistente a *Botrytis*, em que dita seleção compreende detectar em cromossoma 4, 6, 9, 11 e/ou 12 de dita planta de tomate receptora pelo menos um marcador genético ligado a dito pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis*;

20 - em que a localização de dito QTL em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT50, C2At1g74970, P14M49-283e, P14M48-74e, P14M50-67e, CT1739 e P14M50-85h em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*.

25 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a localização de dito QTL em cromossoma 6 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P22hf50-188h, P14M48-52le, P15M48-386h, P18M51-199h, P18M51-103h, P22M50-103e, P18M51-388e, P15M48-395e, P22MSO-124e, P14M48-160e e P22M50-513h em cromossoma 6 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 6 de

*S. lycopersicum*,

- em que a localização de dito QTL em cromossoma 9 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P18M50-141, P14M49-240, TG254, SG223, TG10, P18M50-134h, P14M49-243h, P18M50-599, P14M60-222h, P22M51-417h, P14M50-174h, P14M60-157h, P14M60-107h, P15M48-138b, P14M48-113h, Tm2a, P18M51-146h, P14M48-282h e P14M50-276h em cromossoma 9 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 9 de *S. lycopersicum*,

- em que a localização de dito QTL em cromossoma 11 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P14M60.215e, P14M61-173h, P14M50-307h, TG47, P14M50-29xCD, P18M51-358h, P18M50-27xCD, P18M51-136h, P22M50-488h, TG393, P14M61-396h, P22M51-235h e P22M51-174e em cromossoma 11 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 11 de *S. lycopersicum*,

- em que a localização de dito QTL em cromossoma 12 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT19, TG68, P14M48-411e, P18M50-244h, P18M50-273h, P14M61-420h, P14M61-406h, P14M61-223h, P14M60-193h, P22M51-314h, TG565, P14M48-172h, P22M50m321e, P14M60-219e, P14M48-153h, P22M50-97h, TG296, P22M50-131h e P22M51-135h, preferivelmente por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P14M61-420h, P14M61-406h, P14M61-223h, P14M60-193h, P22M51-314h, TG565, P14M48-172h, P22M50-321e, P14M60-219e, P14M48-153h, P22M50-97h, TG296, e P22M50-131h em cromossoma 12 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 12 de *S. lycopersicum*.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que dita transferência de ácido nucleico compreendendo pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis*, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, é realizada cruzando dita planta de tomate

doadora resistente a *Botrytis* com uma planta de tomate receptora susceptível a *Botrytis* para produzir plantas descendentes compreendendo dito QTL como uma introgressão, e em que etapa c) é realizada em uma ou mais plantas descendentes.

5                   4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que dita transferência de ácido nucleico compreendendo pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis*, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, é realizada por métodos transgênicos (e.g. por transformação), por fusão de protoplastos, por uma técnica de haplóide duplicado ou por resgate de embriões.

                    5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que etapa c) é realizada detectando dito marcador genético em DNA isolado de ditas plantas de tomate receptoras.

15                   6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que dita etapa c) compreende adicionalmente sujeitar ditas plantas a um bioensaio para medir resistência a *Botrytis* em ditas plantas.

                    7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que etapa c) compreende adicionalmente  
20                   selecionar uma planta que compreende dentro de seu genoma pelo menos um QTL para resistência a *Botrytis* selecionado a partir dos QTLs localizados em cromossoma 1, 2 e 4 de *S. habrochaites* LYC 4/78

                    - em que a localização de dito QTL em cromossoma 1 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores  
25                   genéticos P22MS0-412h, P14M60-349h, P14M60-69h, P14M49-192h, P14M49-232h, P14M49-260e, P14M50-503h, P18M50-124h e P14M49-114h em cromossoma 1 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 1 de *S. lycopersicum*,

                    - em que a localização de dito QTL em cromossoma 2 de dita

planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P14M60-537h, P15M48-257e, P14M49-327h, P14M49-325h, P14M61-286e, P14M61-126h, P18M51-134h e CT128 em cromossoma 2 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 2 de *S. lycopersicum*,

5 - em que a localização de dito QTL em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P18M51e169.5e, P18M51-305.4h, P14M60-262.9e, e P14M61-292.7h em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*.

10 8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que etapa c) compreende selecionar:

- uma planta que compreende dentro de seu genoma pelo menos 4 QTLs para resistência a *Botrytis* selecionados a partir do grupo consistindo dos QTLs definidos em reivindicação 1, 2 e 7,

15 - uma planta que compreende dentro de seu genoma pelo menos 2 QTLs para resistência a *Botrytis* selecionados a partir do grupo consistindo dos QTLs definidos em reivindicação 1 e 2.

20 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente etapa d) de cruzar dita planta selecionada em etapa c) com uma planta de uma linhagem de tomate cultivada para produzir plantas descendentes.

10. Planta de tomate resistente a *Botrytis* ou parte da mesma, caracterizada pelo fato de ser obtida por um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

25 11. Local de característica quantitativa (QTL) para resistência a *Botrytis* em *S. lycopersicum*, caracterizado pelo fato de que dito QTL é selecionado a partir do grupo consistindo dos QTLs em cromossomas 4, 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites* LYC 4/78 associado com resistência a *Botrytis* como definido em reivindicação 1 ou 2.

12. Amostra de DNA isolado, caracterizada pelo fato de ser obtida a partir de uma planta de tomate da espécie *S. lycopersicum* compreendendo um QTL como definido na reivindicação 11.

13. Método para detectar um local de característica quantitativa (QTL) para resistência a *Botrytis*, caracterizado pelo fato de que compreende detectar pelo menos um marcador genético ligado a um QTL para resistência a *Botrytis* derivado de *S. habrochaites* LYC 4/78 em cromossoma 4, 6, 9, 11 e/ou 12 de uma planta de tomate resistente a *Botrytis* suspeita,

- em que a localização de dito QTL em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT50, C2At1g74970, P14M49-283e, P14M48-74e, P14M50-67e, CT1739 e P14M50-85h em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*,

- em que a localização de dito QTL em cromossoma 6 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P22hf50-188h, P14M48-52le, P15M48-386h, P18M51-199h, P18M51-103h, P22M50-103e, P18M51-388e, P15M48-395e, P22MSO-124e, P14M48-160e e P22M50-513h em cromossoma 6 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 6 de *S. lycopersicum*,

- em que a localização de dito QTL em cromossoma 9 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P18M50-141, P14M49-240, TG254, SG223, TG10, P18M50-134h, P14M49-243h, P18M50-599, P14M60-222h, P22M51-417h, P14M50-174h, P14M60-157h, P14M60-107h, P15M48-138b, P14M48-113h, Tm2a, P18M51-146h, P14M48-282h e P14M50-276h em cromossoma 9 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 9 de *S. lycopersicum*,

- em que a localização de dito QTL em cromossoma 11 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores

genéticos P14M60.215e, P14M61-173h, P14M50-307h, TG47, P14M50-29xCD, P18M51-358h, P18M50-27xCD, P18M51-136h, P22M50-488h, TG393, P14M61-396h, P22M51-235h e P22M51-174e em cromossoma 11 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 11 de *S. lycopersicum*, e

5 - em que a localização de dito QTL em cromossoma 12 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT19, TG68, P14M48-411e, P18M50-244h, P18M50-273h, P14M61-420h, P14M61-406h, P14M61-223h, P14M60-193h, P22M51-314h, TG565, P14M48-172h, P22M50m321e, P14M60-219e, P14M48-153h, 10 P22M50-97h, TG296, P22M50-131h e P22M51-135h, preferivelmente por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P14M61-420h, P14M61-406h, P14M61-223h, P14M60-193h, P22M51-314h, TG565, P14M48-172h, P22M50-321e, P14M60-219e, P14M48-153h, P22M50-97h, TG296, e P22M50-131h em cromossoma 12 de *S. habrochaites* ou em 15 cromossoma 12 de *S. lycopersicum*.

14. Planta resistente a *Botrytis* da espécie *S. lycopersicum*, ou parte da mesma, caracterizada pelo fato de que compreende dentro de seu genoma pelo menos um QTL, ou uma parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo, em que dito QTL é selecionado a partir do grupo consistindo dos 20 QTLs em cromossoma 4, 6, 9, 11 e 12 de *Solanum habrochaites* associado com resistência a *Botrytis*,

- em que a localização de dito QTL em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos CT50, C2At1g74970, P14M49-283e, P14M48-74e, P14M50-67e, 25 CT1739 e P14M50-85h em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*, em que dito QTL ou dita parte conferindo resistência a *Botrytis* do mesmo não está em seu perfil genético congênita, e

- em que dita planta opcionalmente compreende adicionalmente um ou mais QTLs adicionais ou partes conferindo resistência

a *Botrytis* do mesmos, associados com resistência a *Botrytis* selecionados a partir dos QTLs em cromossoma 1, 2 e/ou 4 de *Solanum habrochaites*, preferivelmente de linhagem LYC 4/78 de *Solanum habrochaites*, em que a localização de dito QTL adicional em cromossoma 4 de dita planta é indicada por uma região genômica compreendendo os marcadores genéticos P18M51-169.5e, P18M51-305.4h, P14M60-262.9e, P14M61-292.7h, TG609, P14M48-345e, P14M48-177e e P18M50-147e em cromossoma 4 de *S. habrochaites* ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum*, mais preferivelmente em cromossoma 4 de *S. habrochaites* LYC 4/78 ou em cromossoma 4 de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

15. Planta de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a localização de ditos QTLs em cromossomas 1, 2, 6, 9, 11, e/ou 12 é como definida em reivindicações 1, 2 e/ou 7.

16. Método para produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis*, a dita planta de tomate sendo uma planta de tomate congênita, caracterizado pelo fato de compreender

a) produzir uma planta de tomate resistente a *Botrytis* como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9;

b) cruzar dita planta de tomate resistente a *Botrytis* com ela própria ou outra planta de tomate para produzir semente de tomate de progênie;

c) desenvolver dita semente de tomate de progênie de etapa para produzir plantas de tomate resistentes a *Botrytis* adicionais;

d) repetir as etapas de cruzamento e cultivo de 0 a 7 vezes para gerar uma planta de tomate congênita resistente a *Botrytis*.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que etapa c) compreende adicionalmente a etapa de identificar plantas que exibem resistência a *Botrytis* e possuem características desejáveis comercialmente.

18. Método de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que dito método compreende adicionalmente a etapa de selecionar plantas de tomate congênicas homocigotas.

5 19. Planta de tomate resistente a *Botrytis* ou partes da mesma, a dita planta de tomate sendo uma planta de tomate congênica, caracterizada pelo fato de ser obtida pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 16 a 18.

- 10 20. Planta de tomate híbrida ou partes da mesma, que exibe resistência a *Botrytis*, caracterizada pelo fato de que dita planta de tomate híbrida é viável cruzando uma planta de tomate congênica resistente a *Botrytis* obtida por um método como definido em qualquer uma das reivindicações 16 a 18 com uma planta de tomate congênica que exibe características desejáveis comercialmente.

15 21. Cultura de tecido, caracterizada pelo fato de ser de células regeneráveis das plantas de tomate como definidas em qualquer uma das reivindicações 10, 14, 15, 19 ou 20, preferivelmente ditas células regeneráveis compreendem células ou protoplastos isolados de um tecido selecionado a partir do grupo consistindo de folhas, pólen, embriões, raízes, ápices radiculares, anteras, flores, frutos, e caules e sementes.

20 22. Uso de um marcador genético selecionado do grupo consistindo dos marcadores genéticos de Tabelas 1-5, caracterizado pelo fato de ser para a detecção de QTLs para resistência a *Botrytis*, e/ou para a detecção de plantas de tomate resistentes a *Botrytis*.

RESUMO

“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA DE TOMATE RESISTENTE A BOTRYTIS, PLANTA DE TOMATE RESISTENTE A BOTRYTIS OU PARTE DA MESMA, LOCAL DE CARACTERÍSTICA QUANTITATIVA PARA RESISTÊNCIA A BOTRYTIS EM S. LYCOPERSICUM, AMOSTRA DE DNA ISOLADO, MÉTODO PARA DETECTAR UM LOCAL DE CARACTERÍSTICA QUANTITATIVA PARA RESISTÊNCIA A BOTRYTIS, PLANTA RESISTENTE A BOTRYTIS DA ESPÉCIE S. LYCOPERSICUM OU PARTE DA MESMA, PLANTA DE TOMATE HÍBRIDA OU PARTES DA MESMA, CULTURA DE TECIDO, E, USO DE UM MARCADOR GENÉTICO”

A presente invenção se refere a um método para detectar um local de característica quantitativa (QTL) associado com resistência a *Botrytis cinerea* em tomate, compreendendo as etapas de cruzar uma planta de tomate doadora resistente a *Botrytis* com uma planta de tomate receptora não resistente ou susceptível a *Botrytis*, colocando em contato uma ou mais plantas descendentes com uma quantidade não eficaz de *Botrytis*, determinando quantitativamente a incidência de doença e/ou a taxa de crescimento de lesão em dita uma ou mais plantas descendentes, estabelecendo um mapa de ligação genética que liga a incidência de doença e/ou taxa de crescimento de lesão com a presença de marcadores cromossômicos de dita planta de tomate doadora em dita uma ou mais plantas descendentes, e determinando para um QTL os marcadores contíguos em dito mapa que estão ligados a uma incidência de doença reduzida e/ou uma taxa de crescimento de lesão reduzida.