

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

ADENILSON MROGINSKI DE SOUZA

MAPEAMENTO DE QTLs PARA TOLERÂNCIA À MURCHA BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum* Smith) EM TABACO

PONTA GROSSA
2018

ADENILSON MROGINSKI DE SOUZA

MAPEAMENTO DE QTLs PARA TOLERÂNCIA À MURCHA BACTERIANA (*Ralstonia solanacearum* Smith) EM TABACO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de concentração Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

PONTA GROSSA
2018

S729 Souza, Adenilson Mroginski de
Mapeamento de QTLs para tolerância à murcha bacteriana
(*Ralstonia solanacearum* Smith) em tabaco/ Adenilson Mroginski de
Souza. Ponta Grossa, 2018.
42 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração –
Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

1. *Ralstonia solanacearum*. 2. Resistência. 3. QTL. 4.
SNP. 5. *Nicotiana tabacum*. I. Matiello, Rodrigo Rodrigues. II.
Universidade Estadual de Ponta Grossa- Mestrado em
Agronomia. III. T.

CDD: 633.71



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: **“Mapeamento de QTLs para tolerância à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith) em tabaco”.**

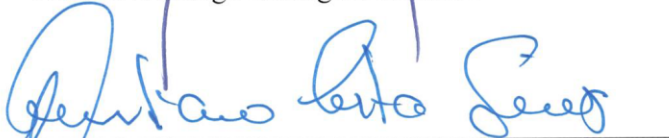
Nome: Adenilson Mroginski de Souza

Orientador: Rodrigo Rodrigues Matiello

Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello



Dr. Christiano Costa Simões



Drª Caroline de Jesus Coelho

Data da Realização: 27 de setembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao curso de pós-graduação em Agronomia e a todas as pessoas sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello, pela orientação. Deixo aqui o meu respeito, admiração e gratidão por ter acreditado e depositado sua confiança em mim durante a realização do trabalho.

Aos Drs. Christiano Costa Simões e Vinícius Almir Weiss pela ajuda fundamental no decorrer da realização deste trabalho e por todo o tempo dedicado.

Agradeço especialmente à minha esposa Érica, por toda compreensão, ajuda e amor dispensado. Sem o seu apoio eu jamais teria alcançado êxito. Expresso aqui meu grande amor por você. Obrigado por tudo.

Aos meus pais, Altevir e Veronica, pelo amor, apoio e incentivo em todas as fases da minha vida.

Aos queridos colegas de trabalho na Souza Cruz: Rafaela Gorski, Claudimere Lisboa Ribas, Carmen Pinto, Lucimara Aparecida Ferreira, Viviana Costa, Simone Cavalet, Anderson Hykavy, Geisa Prazeres, Fernanda Gomes, Arlete Buch, Kelly Wojakevicz e Luis Felipe Boaretto, pela ajuda fundamental na realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram a obtenção de um mapa genético de alta densidade utilizando marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) obtidos através de genotipagem por sequenciamento (GBS) e identificar as regiões genômicas ligadas à tolerância à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith) em uma população de duplo-haploides (DH) de tabaco. As linhagens endogâmicas NC95 (tolerante) e NC2326 (suscetível) foram cruzadas entre si gerando a população F₁, anteras foram coletadas destas plantas para produção de haploides e posterior duplicação cromossômica através da cultura de anteras, gerando 180 famílias duplo-haploides que foram avaliadas em ambiente controlado quanto à tolerância à murcha bacteriana, após inoculação com *R. solanacearum*, através de uma escala de notas com amplitude de 0 a 4. As famílias DH foram genotipadas utilizando a metodologia de GBS e os dados resultantes desta genotipagem foram alinhados com o genoma de referência do tabaco para posterior obtenção dos marcadores SNP utilizados na construção do mapa de ligação. O mapa de ligação juntamente com os dados de fenotipagem foram utilizados para realizar o mapeamento de QTLs através do mapeamento por intervalo composto. Foram identificados 6.842 SNPs, utilizados para construção de um mapa de ligação com 70.583 cM, sendo este o maior mapa de ligação utilizando marcadores SNP disponível para tabaco e com o maior número de marcadores. Utilizando este mapa de ligação foram mapeados 13 QTLs para tolerância à murcha bacteriana em oito grupos de ligação, dos quais oito QTLs ainda não tinham sido identificados na literatura especializada. Os locos presentes nos grupos de ligação 3, 17 e 22 apresentaram os maiores efeitos na variação fenotípica. O elevado número de QTLs mapeados nesta população confirma o padrão de herança quantitativa da tolerância de tabaco à murcha bacteriana causada por *R. solanacearum*.

Palavras-chave: *Ralstonia solanacearum*. Resistência. QTL. SNP. *Nicotiana tabacum*.

ABSTRACT

The objectives of this work were to obtain a high-density genetic map using SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers obtained through Genotyping-by-Sequencing (GBS) and to identify the genomic regions linked to bacterial wilt tolerance (*Ralstonia solanacearum* Smith) in a tobacco double-haploid (DH) population. The inbred lines NC95 (tolerant) and NC2326 (susceptible) were crossed generating the F₁ population, anthers were collected from these plants for haploid production and subsequent chromosomal duplication using anthers culture, generating 180 double-haploid families that were evaluated in a controlled environment for tolerance to bacterial wilt after inoculation with *R. solanacearum*, using an assessment scale from 0 to 4. The DH families were genotyped using the GBS methodology and the resulting data from this genotyping were aligned with the reference genome and then to obtain the SNP markers used to construct the genetic linkage map. The linkage map jointly with the phenotyping data were used to QTL mapping through the composite interval mapping method. A total of 6,842 SNPs was identified and used to construct a linkage map with 70,583 cM, being the largest SNP-based genetic linkage map available for tobacco and presenting the highest number of markers. Using this linkage map, 13 QTLs were mapped for bacterial wilt tolerance in eight linkage groups, from those eight QTLs had not yet been identified in the specialized literature. The loci present in linkage groups 3, 17 and 22 had the highest effects on phenotypic variation. The high number of QTLs mapped in this population confirms the quantitative genetic control of tobacco tolerance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*. Resistance. QTL. SNP. *Nicotiana tabacum*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação da escala de notas utilizada para fenotipagem da severidade de murcha bacteriana em mudas de tabaco inoculadas com *Ralstonia solanacearum*.....27
- Figura 2 – Distribuição de frequência das famílias duplo-haploides de tabaco em cada classe de severidade de murcha bacteriana (%)......29
- Figura 3 – Distribuição do LOD *score* ao longo dos grupos de ligação 3 (A), 4 (B), 6 (C), 8 (D), 12 (E), 17 (F), 21 (G) e 22 (H) onde foram mapeados QTLs para tolerância à murcha bacteriana por intervalo composto. No eixo das ordenadas é representado a distância em cM em relação ao início do grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD *score*....31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resultado da análise de ligação de SNPs na construção do mapa genético da população de duplo-haploides para mapeamento de QTLs para tolerância à murcha bacteriana em tabaco.....30
- Tabela 2 – Posição, LOD *score*, efeitos e proporção da variação fenotípica explicada pelos QTLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto na população de mapeamento para tolerância à murcha bacteriana em tabaco.....30
- Tabela 3 – Posição, LOD *score* e proporção da variação fenotípica explicada pelos QTLs mapeados em diferentes trabalhos de mapeamento para tolerância à murcha bacteriana em tabaco.....36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	A CULTURA DO TABACO	11
2.1.1	A cultura do tabaco no mundo	11
2.1.2	A cultura do tabaco no Brasil	12
2.1.3	Grupos varietais Virgínia e Burley	13
2.2	A MURCHA BACTERIANA	14
2.2.1	Murcha bacteriana no tabaco	14
2.2.2	<i>Ralstonia solanacearum</i> Smith	15
2.3	CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS À DOENÇAS	16
2.4	POPULAÇÕES DE MAPEAMENTO	18
2.5	MARCADORES MOLECULARES	18
2.5.1	Marcador SNP (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>).....	19
2.6	MAPEAMENTO DE QTLs	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	MAPEAMENTO DE QTLs PARA TOLERÂNCIA À MURCHA BACTERIANA EM TABACO	23
5	CONCLUSÕES	37
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

O tabaco é originário das Américas Central e do Sul onde era utilizado pelos ameríndios em ritos religiosos e com fins medicinais. Após o descobrimento da América foi levado para a Europa onde o consumo se popularizou e se espalhou, levando o tabaco a se tornar uma das culturas não alimentícias mais importantes do mundo (PEEDIN, 1999; 2011).

Atualmente o tabaco é produzido em várias regiões do mundo e destacam-se como principais produtores a China, o Brasil, os Estados Unidos, a Índia e o Zimbábue (KIST et al., 2016; MENDES et al., 2015; SANTOS et al., 2017). A produção mundial, na safra 2016/17, foi de 4,78 milhões de toneladas (SANTOS et al., 2017). O Brasil é segundo maior produtor mundial de tabaco e principal país exportador, desde 1993 (SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012). Com uma produção de 719,4 mil toneladas na safra 2016/17 (SANTOS et al., 2017), o setor gera mais de 2,14 milhões de empregos diretos e indiretos, distribuindo renda para milhares de pessoas (KIST et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

A produção brasileira está concentrada na região Sul, sendo esta responsável pela maior parte das exportações. O faturamento total de aproximadamente 7,6 bilhões de reais no ano de 2015 (KIST et al., 2016) colocou o tabaco como uma importante cultura agrícola para o país e demonstrou a grande vantagem competitiva do produto brasileiro no mercado internacional. Porém, medidas devem ser implementadas visando aumentar a produtividade do tabaco, uma vez que vem incrementando significativamente o uso das terras para produção de alimentos e biocombustíveis (HARPER, 2014).

A ocorrência de doenças em plantas de tabaco é um dos fatores limitantes para o aumento da produtividade das lavouras. A murcha bacteriana se destaca como uma das principais doenças que afetam várias culturas, incluindo o tabaco, e tem causado grandes perdas em várias partes do mundo.

A murcha bacteriana é uma doença de solo causada pela bactéria patogênica *Ralstonia solanacearum* Smith. A bactéria pode colonizar muitas culturas de importância econômica, principalmente espécies da família *Solanaceae*, como batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*), berinjela (*S. melongena*) e o tabaco (*Nicotiana tabacum*). Considerada por muitos pesquisadores como a doença com maior poder de destruição das lavouras, a murcha bacteriana é amplamente distribuída nas áreas tropicais, subtropicais e em algumas regiões temperadas (LAN et al., 2014).

Atualmente, o controle da murcha bacteriana através de métodos químico, biológico ou uso de rotação de culturas tem se mostrado pouco eficiente, principalmente, por se tratar de

uma bactéria de solo que possui mais de 200 hospedeiros diferentes que mantêm a bactéria incubada causando o ressurgimento da doença em ocasiões futuras. Uma alternativa para controlar o avanço da doença nas culturas comerciais é a utilização de cultivares tolerantes.

Alguns trabalhos mostram que a tolerância à murcha bacteriana em espécies como batata (CHEN et al., 2013), tomate (CARMEILLE et al., 2006; GEETHANJALI et al., 2010; KIM et al., 2016; WANG et al., 2013), berinjela (LEBEAU et al., 2013) e tabaco (DRAKE-STOWE et al., 2017; KIBA et al., 2007; LAN et al., 2014; MAIMBO et al., 2010; NISHI et al., 2003; QIAN et al., 2013; QIAN et al., 2016) apresenta herança poligênica. Neste contexto, ferramentas que possibilitem a identificação de marcadores moleculares devem ser usadas visando a identificação do maior número de regiões genômicas ligadas à tolerância a murcha bacteriana e a obtenção de maior sucesso na seleção artificial de plantas tolerantes.

Para o desenvolvimento de novos cultivares com tolerância à murcha bacteriana, podem ser utilizadas ferramentas como marcadores moleculares para seleção assistida. Uma vez identificadas as marcas ligadas à característica de interesse, é possível selecionar plantas com maior nível de tolerância sem que seja necessário trabalhar com inoculação do patógeno. Dessa forma, diminui-se o risco de disseminação da doença e reduz a chance de selecionar falsos tolerantes que podem ocorrer devido a escapes de inoculação. Por outro lado, a complexidade genética da tolerância à murcha bacteriana traz um desafio para o mapeamento através de marcadores moleculares, pois grande parte das marcas podem explicar apenas uma pequena parte da variação do fenótipo. Para contornar essa dificuldade, podem ser recomendadas técnicas como o mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Locus*) (QIAN et al., 2013) ou uso de GWS (*Genome Wide Selection*).

Alguns trabalhos de mapeamento de QTLs para tolerância de tabaco à murcha bacteriana foram realizados utilizando marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (NISHI et al., 2003) e SSR (*Simple Sequence Repeat*) (DRAKE-STOWE et al., 2017; LAN et al., 2014; QIAN et al., 2013) nos quais foram mapeados um (NISHI et al., 2003), três (DRAKE-STOWE et al., 2017), quatro (QIAN et al., 2013) e oito QTLs (LAN et al., 2014). Porém, nestes trabalhos foi possível mapear apenas uma pequena parte do genoma, com baixa densidade de marcadores, o que limita a obtenção de informações sobre o real número de locos que podem estar ligados ao controle genético da tolerância à murcha bacteriana em tabaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO TABACO

2.1.1 A cultura do tabaco no mundo

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) é uma planta da família *Solanaceae*, originária das Américas Central e do Sul, onde provavelmente surgiu nas margens das florestas de média e baixa altitude (TSO, 1999). Estudos morfológicos, ecológicos, genéticos e citogenéticos mostram que a espécie *N. tabacum* foi originada através de uma hibridização interespecífica natural que aconteceu em torno de 200 mil anos atrás. A anfiploidia e a subsequente duplicação do número de cromossomos levou à estabilização. A espécie *N. sylvestris* ($2n=2x=24$) foi a doadora do citoplasma enquanto que a *N. tomentosiformis* ($2n=2x=24$) foi a doadora do pólen (LEITCH et al., 2008).

O tabaco, *N. tabacum*, que possui $2n=4x=48$ é classificado como alotetraplóide, com genoma de 4,5 Gb, sendo que mais de 70% de sua constituição é de repetições (SIERRO et al., 2014), além disso, possui aproximadamente 69.500 genes (EDWARDS et al., 2017) e mais de 4 mil compostos envolvidos no metabolismo (HORN; WOODARD; HOWARD, 2004).

A origem da utilização do tabaco aconteceu com os ameríndios que o consumiam de diferentes formas e atribuíam ao tabaco um caráter sagrado, empregando-o em ritos mágico-religiosos, bem como para fins medicinais, para cura de ferimentos, enxaquecas e dores de estômago, sendo o uso reservado exclusivamente aos pajés (JACOBS, 1997; RANDALL, 1999).

No século XVI, após o descobrimento da América, o tabaco foi levado para a Europa, onde foi cultivado inicialmente como uma planta ornamental e por sua função medicinal (RANDALL, 1999). Posteriormente, o consumo do tabaco tornou-se popular, passando das crenças e rituais dos indígenas, para a mais importante cultura agrícola não alimentícia do planeta (PEEDIN, 1999; 2011).

Atualmente a produção mundial, na safra 2016/17, foi de 4,78 milhões de toneladas (SANTOS et al., 2017). Entre os principais produtores mundiais estão a China, o Brasil, a Índia, os Estados Unidos e o Zimbábue (KIST et al., 2016; MENDES et al., 2015; SANTOS et al., 2017).

2.1.2 A cultura do tabaco no Brasil

O tabaco acompanhou as migrações dos ameríndios por toda a América Central, até chegar ao território brasileiro. Quando os europeus chegaram ao Brasil, o tabaco já era cultivado e utilizado onde, apesar das diferentes formas de uso, se destacava o hábito de fumar (RATOCHINSKI, 2015).

O início da produção de tabaco pelos colonos surgiu da necessidade de garantir o suprimento próprio. Com a procura crescente o excedente de produção começou a ser comercializado, principalmente para a Europa.

No século XVII iniciou a produção de tabaco no Brasil com fins comerciais, sobretudo na Região Nordeste, pelo incentivo de Portugal. O tabaco passou a figurar entre os principais produtos exportados durante o período do Império Português no país (SINDITABACO, 2016).

Após 1850, os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina começaram a se destacar na produção em função do cultivo em pequenas propriedades rurais, principalmente nas regiões colonizadas por alemães. Com o crescente aumento do consumo de cigarros intensificou-se a produção de tabacos claros ideais para este fim e conseqüentemente diminuiu a produção de tabacos escuros utilizados para produzir charutos (SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012).

A partir da década de 40 a Região Sul já se apresentava como a maior produtora de tabaco, com destaque, a partir de 1970, para o Paraná e Santa Catarina que se consolidaram como segundo e terceiro maiores produtores nacionais, respectivamente, atrás apenas do Rio Grande do Sul. Em 2006 os três estados do Sul já respondiam por 96,8% da produção nacional (SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012).

O crescimento progressivo da produção de tabaco no Sul do país, fez com que o Brasil alcançasse atualmente a posição de segundo maior produtor mundial de tabaco e, desde 1993, o posto de principal país exportador (KIST et al., 2016; SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012), com volume exportado de 517 mil toneladas em 2015, seguido por Índia e Zimbábue com 240 e 152 mil toneladas exportadas, respectivamente (KIST et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

Os tabacos claros dos grupos varietais Virgínia e Burley são os mais produzidos atualmente no Sul do Brasil. Esses tabacos são os preferidos pelo mercado internacional por gerarem produtos do tipo *flavour*, que dão sabor ao cigarro (SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012; SILVEIRA, 2016).

A produção brasileira de tabaco alcançou na safra de 2016/17 o volume de 719,4 mil toneladas. A região Sul do Brasil responde por 98% da colheita brasileira de tabaco (705,9 mil t), a segunda maior do mundo e líder na exportação, com uma área plantada total de 311.130 ha na safra 2016/17 (SANTOS et al., 2017).

Do total produzido no Brasil em torno de 85%, após ser beneficiado industrialmente, é exportado, sendo o restante da produção consumido internamente pelas fábricas de cigarros instaladas no país (KIST et al., 2016; MENDES et al., 2015; SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012; SILVEIRA, 2016).

O bom desempenho do Brasil na produção de tabaco deve-se às características ambientais favoráveis de solo e clima existentes nos locais de produção. Os altos índices de qualidade e de produtividade do tabaco estão ligados com a consolidação do complexo agroindustrial e com o crescente aperfeiçoamento tecnológico do modo de produção. Isto tem sido favorável à competitividade da produção e exportação brasileira (SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012, SILVEIRA, 2016).

Nos últimos anos houve um aumento da produtividade nas lavouras de tabaco. Silveira; Dornelles e Ferrari (2012) evidenciam que em 1996 a produtividade média era de 1,55 t ha⁻¹ e, em 2006, foi ampliado para 2,03 t ha⁻¹. Já na safra 2016/17 alcançou 2,31 t ha⁻¹ (SANTOS et al., 2017). A introdução de novas normas técnicas de produção agrícola e de cura do tabaco tem fundamental importância para este aumento de produtividade. Assim como o uso, cada vez mais constante, de novas tecnologias envolvendo sementes de maior qualidade, o emprego do sistema *float* para o cultivo das mudas, a utilização de novos fertilizantes e agrotóxicos, uso de cultivares superiores, entre outros (BARRETO; NOVAIS, 2016; SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012, SILVEIRA, 2016).

Silveira; Dornelles e Ferrari (2012) ressaltam que parte do aumento de produtividade alcançado pelos produtores brasileiros deve-se ao uso de sementes híbridas de tabaco produzidas através do uso de técnicas de melhoramento genético que selecionam genótipos superiores e possibilitam a produção de sementes com maior qualidade, produtividade e resistência aos nematoides e às doenças e pragas comuns à lavoura do tabaco.

2.1.3 Grupos varietais Virgínia e Burley

O tabaco é dividido em grupos varietais que são uma subdivisão entre indivíduos de uma mesma espécie que apresentam características morfogênicas semelhantes. Dentre os grupos

varietais destacam-se Virgínia, Burley, Maryland, Dark, Galpão Comum, Amarelinho e Oriental (LEGG; SMEETON, 1999).

No Brasil, atualmente, os mais plantados são o Virgínia, para o grupo de tabacos curados em estufa, e o Burley para o grupo dos tabacos de galpão (SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012), os quais representaram, um total de área cultivada na safra 2015/2016 de 231.640 e 36.340 ha, respectivamente (KIST et al., 2016). Na safra 2016/17 a área cultivada com estes grupos varietais foi de 254.950 ha para Virgínia e 39.940 ha para Burley (SANTOS et al., 2017). Isto se deve ao aumento da demanda do mercado mundial de cigarros por tabacos claros como Virginia e Burley, especialmente na China, Japão, nos países da Comunidade Europeia, do Leste europeu, e no Sudeste Asiático (SILVEIRA; DORNELLES; FERRARI, 2012, SILVEIRA 2016).

Segundo Mendes et al. (2015) o tabaco Virgínia se firma cada vez mais como o tipo de tabaco mais produzido no Brasil e representou 87,4% do total produzido na região Sul do Brasil na safra 2016/17, com um volume de 616,7 mil toneladas produzidas (SANTOS et al., 2017). Já o tipo Burley vem diminuindo sua participação, com um volume de 80,4 mil toneladas produzidos na safra 2016/17, representa 11,4% do total. A expectativa para a safra 2017/18 é que as proporções percentuais em área e produção devam se manter (SANTOS et al., 2017).

2.2 A MURCHA BACTERIANA

2.2.1 Murcha bacteriana no tabaco

A produtividade das lavouras de tabaco tem aumentado ao longo dos últimos anos. Apesar disso, muitas lavouras são perdidas em decorrência de doenças, principalmente a murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*.

O patógeno não afeta somente solanáceas, mas muitas plantas daninhas, culturas, arbustos e árvores em outras famílias mono e dicotiledôneas. Apesar de apresentar a mesma etiologia, resultando em sintomas de murcha, similar na maioria dos hospedeiros, diferentes nomes de doenças são utilizados dependendo da cultura em questão (GENIN; DENNY, 2012).

As perdas diretas causadas por murcha bacteriana variam de acordo com a cultura, cultivar, tipo de solo, método de cultivo e estirpe da bactéria (YULIAR; NION; TOYOTA, 2015). As perdas de produtividade podem variar de 0 a 91% em tomate, 33 a 90% em batata, 10 a 30% em tabaco, 80 a 100% em banana e mais de 20% em amendoim (ELPHINSTONE,

2005). Não existem no Brasil dados de perdas causadas pela doença em tabaco (VIANA; BERGER; DUARTE, 2012).

Para prevenir perdas na cultura do tabaco, assim como acontece em outras espécies, o uso de cultivares tolerantes se mostra o mais econômico, ambientalmente correto e efetivo método de controle da murcha bacteriana (HUET, 2014; JACK, 2002; TSO, 1999; YULIAR; NION; TOYOTA, 2015). O melhoramento de plantas voltado a obtenção de cultivares tolerantes à murcha bacteriana tem se concentrado em culturas com grande interesse econômico como tomate, batata, tabaco, berinjela, pimenta e amendoim e é influenciado por fatores como a disponibilidade de fontes de resistência, diversidade, relação genética entre resistência e outras características agronômicas, diferenciação e variabilidade dos isolados do patógeno, mecanismos de interação entre planta e patógeno e método de melhoramento utilizado (HUET, 2014; YULIAR; NION; TOYOTA, 2015).

2.2.2 *Ralstonia solanacearum* Smith

A bactéria *R. solanacearum* é um dos principais fitopatógenos no mundo e ataca mais de 200 espécies de plantas, dentre elas diversas culturas agrícolas. A grande diversidade genética das estirpes responsáveis pelas várias doenças conhecidas como murcha bacteriana tem levado ao conceito de Complexo de Espécies *R. solanacearum* (GENIN; DENNY, 2012).

O conhecimento da variabilidade populacional de *R. solanacearum*, assim como da virulência dos diferentes isolados, pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle da murcha bacteriana, particularmente a resistência de plantas a este patógeno (SANTIAGO et al., 2016; VIANA; BERGER; DUARTE, 2012).

Muitos determinantes moleculares envolvidos na patogenicidade e na especificidade por uma gama de hospedeiros estão descritos, assim como o entendimento de suas funções na patogenicidade e o como a expressão é controlada pela rede reguladora da virulência (GENIN; DENNY, 2012).

Trabalhos têm sido realizados no Brasil com o intuito de estudar a diversidade genética de *R. solanacearum*. Santiago et al. (2016) em estudo utilizando marcadores moleculares, caracterizaram por filotipo e sequevar 301 isolados coletados de diferentes regiões geográficas e diferentes hospedeiros como *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Capsicum* spp., *Piper hispidinervum*, *S. melongena*, *Eucalyptus* sp., *Musa* spp., *S. gilo* e *Geranium* sp. e classificaram estes como filotipo I (48), filotipo IIA (112) e IIB (141) sendo o filotipo II mais distribuído geograficamente e o filotipo I mais concentrado nas regiões Central, Norte e Nordeste. O

filotipo IIB mostrou maior diversidade de sequevares e maior número de hospedeiros. A maioria das sequevares estava associada com regiões geográficas.

Isolados coletados em plantas de tabaco no sudeste dos Estados Unidos foram classificados com pertencentes à raça 1, biovar 1 e filotipo II (HONG et al., 2012; KATAWCZIK; TSENG; MILA, 2016).

Liu et al. (2017) estudaram 97 isolados de quatro diferentes zonas de produção de tabaco na China e identificaram que todos os isolados pertenciam ao filotipo I e sequevares 13, 14, 15, 17, 34, 44, 54 e 55, onde a distribuição das sequevares estava associada com a elevação.

No Brasil, poucos estudos foram conduzidos com isolados provenientes da cultura do tabaco. Viana; Berger e Duarte (2012) estudaram 120 isolados oriundos de solos e plantas de tabaco com murcha bacteriana, coletados no Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraíba e Pernambuco, e os resultados evidenciaram variabilidade genética entre os isolados, apesar de todos pertencerem ao biovar 1 e filotipo II. Após o estudo da diversidade genética os isolados foram divididos, baseados em resultados da rep-PCR, em seis grupos (A, B, C, D, E e F), a partir de 61% de similaridade, independente da origem geográfica, tipo de amostra, época de coleta e cultivar. Além disso, Santiago et al. (2016) demonstraram que na região Sul, onde está concentrada a produção de tabaco, a ocorrência principal é dos biovares 1 e 2 e do filotipo IIA e IIB.

2.3 CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS À DOENÇAS

A interação genética planta-patógeno que controla a resistência às doenças em plantas é explicada pela teoria gene-a-gene ou teoria de Flor, a qual estabelece que plantas hospedeiras possuem genes dominantes de resistência simples (R) que reconhecem especificamente patógenos que possuem genes de avirulência (*avr*) complementares os quais codificam proteínas que são reconhecidas direta ou indiretamente somente por aquelas plantas que contém o gene R complementar. Esse reconhecimento específico resulta na indução da expressão de genes de defesa e inibição de crescimento do patógeno (STASKAWICZ, 2001).

Huet (2014) descreveu dois níveis de imunidade em plantas. O primeiro usa as células da superfície com padrão de reconhecimento de receptores (PRRs) para detectar padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e iniciar uma sequência de reações conhecidas como imunidade associado a PAMPs (PTI). O segundo envolve proteínas com nucleotídeos ligados a regiões ricas de leucina (NB-LRR), codificadas por genes de resistência R os quais

reconhecem efetores do patógeno e induzem uma resposta imune potente chamada de imunidade induzida por efetor (ETI). ETI é mais rápida, mais longa e mais forte que PTI e geralmente leva a morte das células no local, a resposta de hipersensibilidade (HR), a qual paralisa a disseminação do patógeno (COLOMBATTI; GONZALEZ; WELCHEN, 2014).

Alguns efetores que conseguem superar o PTI são reconhecidos pelas proteínas R e o efetor é então chamado de proteína de avirulência (*avr*). Doença (susceptibilidade) acontece na ausência de um ou ambos R/*Avr*. Consequentemente a resistência acontece quando o efetor R e *Avr* estão presentes simultaneamente. A ativação da defesa da planta por uma proteína R é chamada de defesa qualitativa e proporciona resistência completa à doença (HUET, 2014). Cada vez mais tem se voltado a atenção à planta, buscando caracterizar geneticamente os genes R relacionados com os genes *avr* já identificados (STASKAWICZ, 2001).

A identificação de germoplasma resistente em espécies selvagens para introgridir em cultivares comerciais tem sido o foco de muitos melhoristas em boa parte do século XX. Entretanto, muitos melhoristas escolheram utilizar genes simples dominantes ou codominantes em seus programas de melhoramento devido à facilidade e eficácia com que eles conseguiam introduzi-los dentro de cultivares agronomicamente aceitáveis. Então com a possibilidade de isolamento, clonagem e caracterização destes genes R nos últimos anos, este começou a ser o melhor método para escolha de genes R em plantas (STASKAWICZ, 2001).

A tolerância à murcha bacteriana tem herança poligênica (CHEN et al., 2013; DRAKE-STOWE et al., 2017; JACK, 2002; LEBEAU et al., 2013; QIAN et al., 2013; WANG et al., 2013). A caracterização molecular da resistência quantitativa de doenças ainda está começando. Os genes R podem contribuir para tolerância associados a outros compostos como quinases ou transportadores (HUET, 2014).

Existe uma grande dificuldade de conseguir plantas resistentes à murcha bacteriana, por diversos fatores dentre os quais podemos citar a dificuldade de conseguir a combinação entre resistência duradoura e características agrônômicas desejáveis, a necessidade da planta se adaptar à diferentes condições climáticas e à diferentes isolados da bactéria e devido as fontes de resistência terem herança poligênica, portanto o que se encontra com maior frequência são plantas com certos níveis de tolerância (HUET, 2014).

Em tabaco tipo Virgínia já foram encontradas fontes com certos níveis de tolerância à murcha bacteriana nos Estados Unidos, porém em Burley não se teve tanto sucesso (JACK, 2002). O conflito existente entre diversos dados de diferentes locais referentes à natureza do controle genético da tolerância de um mesmo cultivar pode estar ligado a existência de diferentes níveis de pressão da doença nos diversos locais de cultivo (JACK, 2002).

O mapeamento genético da tolerância à murcha bacteriana torna-se cada vez mais necessário para auxiliar no esclarecimento dos locos envolvidos na resposta a esse patógeno e futuro desenvolvimento de cultivares superiores.

2.4 POPULAÇÕES DE MAPEAMENTO

Existem diversos tipos de populações que podem ser utilizadas para o mapeamento genético, cada uma com suas vantagens e desvantagens e isso deve ser levado em consideração durante a escolha da melhor opção. A escolha deve considerar o objetivo do estudo, além do tempo e recursos financeiros disponíveis (SCHUSTER; CRUZ, 2004; VIEIRA et al., 2006).

Em plantas que toleram autofecundação as populações F_n , duplo-haploides, RILs (*Recombinant Inbred Lines*) e populações derivadas de retrocruzamentos podem ser utilizadas.

Os duplo-haploides são obtidos pela duplicação cromossômica de plantas haploides através da cultura de anteras ou de embriões haploides imaturos. Todos os indivíduos obtidos são homocigotos perfeitos e por isso podem ser perpetuados. A grande quantidade de sementes disponíveis permite o cultivo em vários locais e a obtenção de uma estimativa mais precisa dos parâmetros quantitativos a serem mapeados, podendo avaliar inclusive a interação genótipo x ambiente. Neste tipo de população não é possível estimar parâmetros associados ao grau de dominância dos locos mapeados (SCHUSTER; CRUZ, 2004).

2.5 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são fragmentos de DNA únicos em termos de tamanho e sequência de nucleotídeos (FALEIRO, 2007) e servem para identificar diferentes formas de polimorfismo existentes no DNA (MAMMADOV et al., 2012). Podem ser representados em mapas de ligação através do arranjo linear com a posição relativa de cada marcador (BRANDLE; BAI, 1999).

O uso de marcadores moleculares apresenta vantagens como a possibilidade de obtenção de grande número de polimorfismos, identificação direta do genótipo sem influência do ambiente e a possibilidade de obter esta informação em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (FALEIRO, 2007).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados para o mapeamento genético estão o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites (BRANDLE; BAI, 1999; FALEIRO, 2007; SCHUSTER; CRUZ, 2004) e o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (CAETANO, 2009; FALEIRO, 2007; MAMMADOV et al., 2012).

A seleção assistida por marcadores (SAM) tem grande importância, pois os marcadores moleculares representam o genótipo da planta, desta forma a SAM não está sujeita às variações ambientais que normalmente afetam a seleção fenotípica (BRANDLE; BAI, 1999; FALEIRO, 2007).

2.5.1 Marcador SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Os SNPs são marcadores moleculares caracterizados pelo polimorfismo em uma única base nitrogenada (A, C, T e G) (FALEIRO, 2007). Ocorre quando uma base (A, C, T ou G) substitui a posição de uma das outras três. São mais comuns as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A ↔ G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C ↔ T). A troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa, é menos frequente (CAETANO, 2009).

Os marcadores SNP geralmente são bialélicos, os quais identificam apenas dois variantes em uma espécie. Como os SNPs ocorrem em abundância no genoma podem estar presentes em regiões codificadoras (com função regulatória), porém são mais comumente encontrados em espaços intergênicos (sem função determinada) (CAETANO, 2009). Quando está localizada em uma região codificadora esta substituição de uma única base pode levar à alteração do aminoácido na proteína, podendo alterar a funcionalidade, conseqüentemente levando à alteração fenotípica (FALEIRO, 2007).

Com o uso dos SNPs é possível detectar grande quantidade de polimorfismo entre os alelos de um determinado gene, por se tratar da classe de polimorfismos mais abundante em espécies não endogâmicas suas bases moleculares permitem que haja uma distribuição homogênea de SNPs pelo genoma (CAETANO, 2009; FALEIRO, 2007).

Devido a abundância no genoma e a adaptabilidade à formatos e plataformas de detecção de alto rendimento, o uso de marcadores baseados em SNPs para estudos de mapeamento de QTLs tem aumentado nos últimos anos (MAMMADOV et al., 2012), gerando mapas como maior resolução quando comparado aos outros marcadores moleculares (JONES

et al., 2007). SNPs são a base molecular de vários tipos de marcadores moleculares como RFLPs, RAPDs, AFLPs, entre outros que foram desenvolvidos através de diferentes metodologias (CAETANO, 2009).

Apresentam grande importância em estudos filogenéticos, mapeamento genético, na diferenciação de alelos de um mesmo gene (FALEIRO, 2007) e na seleção assistida por marcadores (MAMMADOV et al., 2012).

2.6 MAPEAMENTO DE QTLs

O mapeamento de QTLs é uma importante ferramenta para caracterização genética da resistência a doenças, localização dos locos de resistência nos mapas de ligação e identificação de sequências polimórficas de DNA ligadas que possam ser utilizadas para seleção assistida por marcadores durante o melhoramento de plantas (QIAN et al., 2013).

O desenvolvimento de mapas de ligação de alta densidade requer um grande esforço, porém a contribuição destes mapas para o entendimento da organização do genoma das espécies é enorme, assim como a possibilidade de comparação entre as diferentes espécies (BRANDLE; BAI, 1999).

A seleção assistida por marcadores para tolerância à murcha bacteriana é difícil de ser implementada devido à complexidade genética desta característica, porém pode ter sucesso se for baseada em QTLs que são expressos em vários ambientes (QIAN et al., 2013).

Segundo Kim et al. (2016) a *Ralstonia solanacearum* possui vários mecanismos de virulência que ainda não são totalmente entendidos, porém alguns já estão se tornando claros. A informação obtida nos estudos dos mecanismos de virulência da bactéria deve ser utilizada para o mapeamento de QTLs, mecanismos moleculares e proteínas envolvidas na tolerância de plantas a bactérias.

Nishi et al. (2003) utilizando populações de duplo-haploides e marcadores AFLP mapearam um QTL que explica mais de 30% da variação fenotípica para tolerância à murcha bacteriana em tabaco.

Qian et al. (2013) mapearam QTLs em tabaco associados à tolerância à murcha bacteriana em famílias F_{2:3} e F_{2:4} e geraram dois mapas de ligação contendo 118 e 96 locos em 24 grupos de ligação. Destes foram identificados os QTLs qBWR-3a, qBWR-3b, qBWR-5a e qBWR-5b nos grupos de ligação 3 e 5, os quais explicaram 9,0; 19,7; 17,3 e 17,4 % da variância fenotípica para a tolerância, respectivamente. Estes QTLs estão ligados com os marcadores microsatélites PT20275 e PT30229 descritos por Bindler et al. (2007), porém é possível que

os QTLs qBWR-3a e qBWR-3b sejam o mesmo, assim como os QTLs qBWR-5a e qBWR-5b. A identificação de marcadores ligados aos QTLs para tolerância à murcha bacteriana mais próximos que PT30229 e PT20275 é necessária para que se desenvolva uma estratégia de seleção assistida por marcadores mais factível (QIAN et al., 2013).

Lan et al. (2014) mapearam QTLs em tabaco associados à tolerância à murcha bacteriana em famílias F_{2:3} proveniente do cruzamento entre Yanyan 97 e Honghua Dajinyuan e encontraram oito QTLs nos cromossomos 2, 6, 12, 17 e 24. O mais expressivo QTL (qBWR17a) foi detectado no cromossomo 17 e explicou 30% da variação fenotípica em tolerância à murcha bacteriana.

Em estudo com uma população de mapeamento constituída de RILs F_{4:5}, provenientes do cruzamento entre K346 e TI1068, Drake-Stowe e colaboradores (2017) encontraram três QTLs ligados à tolerância à murcha bacteriana nos grupos de ligação (GL) 6, 7 e 19, onde todos os alelos favoráveis foram doados pelo K346. Estes QTLs explicam 8,4; 32,1 e 5,5% da variação fenotípica da área abaixo da curva de progresso da doença para os GL 6, 7 e 19, respectivamente. Segundo os autores os QTLs mapeados nos GL 6 e 7 estão co-localizados com QTLs relacionados à resistência ao patógeno *Phytophthora nicotianae* causador da doença conhecida como black shank, demonstrado que estas regiões são responsáveis pela resistência a múltiplas doenças. Entretanto, os autores afirmaram que estudos mais aprofundados destas regiões devem ser realizados para identificar os genes envolvidos na resistência aos dois patógenos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi identificar regiões genômicas ligadas à tolerância à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a tolerância/suscetibilidade de uma população com 180 famílias de duplo-haploides de tabaco, inoculadas com *R. solanacearum*;
- Identificar marcadores SNP utilizando a técnica de genotipagem por sequenciamento (GBS) em uma população de duplo-haploides de tabaco;
- Construir um mapa de ligação de alta densidade utilizando marcadores SNP obtidos através de GBS;
- Mapear QTLs para a tolerância à murcha bacteriana;
- Quantificar os efeitos dos QTLs mapeados para a tolerância à murcha bacteriana.

4 MAPEAMENTO DE QTLs PARA TOLERÂNCIA À MURCHA BACTERIANA EM TABACO

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram a obtenção de um mapa genético de alta densidade utilizando marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) obtidos através de genotipagem por sequenciamento (GBS) e identificar as regiões genômicas ligadas à tolerância à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith) em uma população de duplo-haploides (DH) de tabaco. As linhagens endogâmicas NC95 (tolerante) e NC2326 (suscetível) foram cruzadas entre si gerando a população F₁, anteras foram coletadas destas plantas para produção de haploides e posterior duplicação cromossômica através da cultura de anteras, gerando 180 famílias duplo-haploides que foram avaliadas em ambiente controlado quanto à tolerância à murcha bacteriana, após inoculação com *R. solanacearum*, através de uma escala de notas com amplitude de 0 a 4. As famílias DH foram genotipadas utilizando a metodologia de GBS e os dados resultantes desta genotipagem foram alinhados com o genoma de referência do tabaco para posterior obtenção dos marcadores SNP utilizados na construção do mapa de ligação. O mapa de ligação juntamente com os dados de fenotipagem foram utilizados para realizar o mapeamento de QTLs através do mapeamento por intervalo composto. Foram identificados 6.842 SNPs, utilizados para construção de um mapa de ligação com 70.583 cM, sendo este o maior mapa de ligação utilizando marcadores SNP disponível para tabaco e com o maior número de marcadores. Utilizando este mapa de ligação foram mapeados 13 QTLs para tolerância à murcha bacteriana em oito grupos de ligação, dos quais oito QTLs ainda não tinham sido identificados na literatura especializada. Os locos presentes nos grupos de ligação 3, 17 e 22 apresentaram os maiores efeitos na variação fenotípica. O elevado número de QTLs mapeados nesta população confirma o padrão de herança quantitativa da tolerância de tabaco à murcha bacteriana causada por *R. solanacearum*.

Palavras-chave: *Ralstonia solanacearum*. QTL. Resistência. SNP. *Nicotiana tabacum*.

ABSTRACT

The objectives of this work were to obtain a high-density genetic map using SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers obtained through Genotyping-by-Sequencing (GBS) and to identify the genomic regions linked to bacterial wilt tolerance (*Ralstonia solanacearum* Smith) in a tobacco double-haploid (DH) population. The inbred lines NC95 (tolerant) and NC2326 (susceptible) were crossed generating the F₁ population, anthers were collected from these plants for haploid production and subsequent chromosomal duplication using anthers culture, generating 180 double-haploid families that were evaluated in a controlled environment for tolerance to bacterial wilt after inoculation with *R. solanacearum*, using an assessment scale from 0 to 4. The DH families were genotyped using the GBS methodology and the resulting data from this genotyping were aligned with the reference genome and then to obtain the SNP markers used to construct the genetic linkage map. The linkage map jointly with phenotyping

data were used to QTL mapping through the composite interval mapping method. A total of 6,842 SNPs was identified and used to construct a linkage map with 70,583 cM, being the largest SNP-based genetic linkage map available for tobacco and presenting the highest number of markers. Using this linkage map, 13 QTLs were mapped for bacterial wilt tolerance in eight linkage groups, from those eight QTLs had not yet been identified in the specialized literature. The loci present in linkage groups 3, 17 and 22 had the highest effects on phenotypic variation. The high number of QTLs mapped in this population confirms the quantitative genetic control of tobacco tolerance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*. QTL. Resistance. SNP. *Nicotiana tabacum*.

INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana é uma doença de solo causada pela bactéria patogênica *Ralstonia solanacearum* Smith. Esta bactéria pode colonizar muitas culturas de importância econômica, principalmente espécies da família *Solanaceae*, como batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*), berinjela (*S. melongena*) e o tabaco (*Nicotiana tabacum*). Considerada por muitos pesquisadores como a doença com maior poder de destruição das lavouras, a murcha bacteriana é amplamente distribuída nas áreas tropicais, subtropicais e algumas regiões temperadas (LAN et al., 2014).

Atualmente, o controle da murcha bacteriana através de métodos químico, biológico ou uso de rotação de culturas tem se mostrado pouco eficiente, principalmente por se tratar de uma bactéria de solo que possui mais de 200 hospedeiros diferentes que mantêm a bactéria incubada causando o ressurgimento da doença em ocasiões futuras. Uma alternativa para controlar o avanço da doença nas culturas comerciais é a utilização de cultivares tolerantes.

Alguns trabalhos mostram que a tolerância à murcha bacteriana em espécies como batata (CHEN et al., 2013), tomate (CARMEILLE et al., 2006; GEETHANJALI et al., 2010; KIM et al., 2016; WANG et al., 2013), berinjela (LEBEAU et al., 2013) e tabaco (DRAKE-STOWE et al., 2017; KIBA et al., 2007; LAN et al., 2014; MAIMBO et al., 2010; NISHI et al., 2003; QIAN et al., 2013; QIAN et al., 2016) apresenta herança poligênica. Neste contexto, ferramentas que possibilitem a identificação de marcadores moleculares devem ser usadas visando a identificação do maior número de regiões genômicas ligadas à tolerância a murcha bacteriana e a obtenção de maior sucesso na seleção artificial de plantas tolerantes.

Para o desenvolvimento de novos cultivares com tolerância à murcha bacteriana, podem ser utilizadas ferramentas como marcadores moleculares para seleção assistida. Uma

vez identificadas as marcas ligadas à característica de interesse, é possível selecionar plantas com maior nível de tolerância sem que seja necessário trabalhar com inoculação do patógeno. Dessa forma, diminui-se o risco de disseminação da doença e reduz a chance de selecionar falsos tolerantes que podem ocorrer devido a escapes no processo de inoculação. Por outro lado, a complexidade genética da tolerância à murcha bacteriana traz um desafio para o mapeamento de QTLs através de marcadores moleculares, pois grande parte das marcas podem explicar apenas uma pequena parte da variação da tolerância. Para contornar essa dificuldade, podem ser recomendadas técnicas como o mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Locus*) (QIAN et al., 2013) ou uso de GWS (*Genome Wide Selection*).

Alguns trabalhos de mapeamento de QTLs para tolerância de tabaco à murcha bacteriana foram realizados utilizando marcadores AFLP (NISHI et al., 2003) e SSR (DRAKE-STOWE et al., 2017; LAN et al., 2014; QIAN et al., 2013) nos quais foram mapeados um (NISHI et al., 2003), três (DRAKE-STOWE et al., 2017), quatro (QIAN et al., 2013) e oito QTLs (LAN et al., 2014). Porém nestes trabalhos foi possível mapear apenas uma pequena parte do genoma, com baixa densidade de marcadores, o que limita a obtenção de informações sobre o real número de locos que podem estar ligados ao controle genético da tolerância à murcha bacteriana do tabaco. Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram a obtenção de um mapa genético de alta densidade utilizando marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) obtidos através de GBS e o mapeamento por intervalo composto de QTLs para tolerância do tabaco à murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* Smith.

MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais foram conduzidas nos anos 2016, 2017 e 2018 nas dependências do Centro de Melhoramento de Tabaco (CMT), da empresa Souza Cruz Ltda., em Rio Negro/PR, utilizando casa de vegetação com ambiente controlado e o Laboratório de Marcadores Moleculares.

Obtenção da população para o mapeamento

A partir do cruzamento das linhagens endogâmicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) NC95 (tolerante) e NC2326 (suscetível), foi obtida a geração F₁. Anteras foram coletadas das plantas F₁ para produção de haploides e posterior duplicação cromossômica através da cultura

de anteras. Os indivíduos duplo-haploides (DH) foram selecionados e autofecundados, dando origem a um total de 180 famílias DH, as quais, juntamente com os parentais, foram avaliadas genotípica e fenotipicamente para a tolerância à murcha bacteriana em condições controladas.

Fenotipagem da tolerância à murcha bacteriana

As mudas de tabaco foram produzidas em ambiente controlado. Inicialmente, foram semeadas em copos plásticos contendo substrato Carolina Soil®, aproximadamente 20 dias após a germinação as mudas foram transferidas para bandejas de poliestireno expandido (EPS) com 200 células e conduzidas em casa de vegetação até atingirem o desenvolvimento adequado para inoculação (após três podas – aproximadamente 30 dias). Posteriormente, foram aclimatadas sob temperatura constante (23-25°C) e fotoperíodo com 12 horas de luz. O experimento foi conduzido em blocos aleatorizados com dez repetições.

A inoculação das plantas com o patógeno *Ralstonia solanacearum*, estirpe coletada em Tubarão/SC e caracterizada como biovar 1 e filotipo II (VIANA; BERGER; DUARTE, 2012), foi realizada através de metodologia de inoculação adaptada de Viana; Berger e Duarte (2012) e Gonçalves et al. (2014). Aproximadamente 30 dias após a repicagem das mudas foi realizado o processo de injúria (ferimento) no terço inferior das raízes com auxílio de tesoura. Após a injúria as bandejas de EPS contendo as mudas foram imediatamente acomodadas em bandejas de alumínio contendo solução de água destilada saturada com *R. solanacearum* (600 mL de solução por bandeja).

O inóculo foi preparado a partir de células de *R. solanacearum* armazenadas em solução salina 0,85% à 4°C, utilizando placas de Petri contendo meio de cultura SPA (sacarose 20g L⁻¹; peptona 10g L⁻¹; ágar 20g L⁻¹), mantidas a 27°C (BOD) por 3 dias. As colônias foram coletadas e diluídas em água destilada autoclavada até densidade ótica por absorbância de 600 nm (OD₆₀₀) = 0,025, que corresponde a 1x10⁶ UFC mL⁻¹.

As avaliações foram realizadas 35 dias após a inoculação, de acordo com a escala de notas de Jack (2001), com intervalo de variação de 0 a 4, onde: 0 - planta sadia; 1 - planta com uma folha amarelada ou murcha; 2 - planta com duas folhas amareladas ou murchas e mais que três folhas sadias no topo da planta; 3 - planta com três folhas sadias no topo da planta e 4 - planta morta (Figura 1). As notas atribuídas para as plantas de cada família DH foram utilizadas para calcular a severidade da doença através da fórmula (1) descrita por Jack (2001).

$$(1) \text{ Severidade da doença (\% de infecção)} = \sum \frac{(n v)}{(Z N)} \%$$

Onde:

n = n° de plantas na classe analisada

v = nota (0 - 4)

Z = maior valor numérico da escala de notas (4)

N = n° total de plantas



Figura 1 – Representação da escala de notas utilizada para fenotipagem da severidade de murcha bacteriana em mudas de tabaco inoculadas com *Ralstonia solanacearum*.

Genotipagem da população de duplo-haploides

O DNA total das plantas de cada família DH foi extraído a partir de amostras de tecido foliar jovem utilizando o protocolo BioSprint DNA Plant (Qiagen®). O procedimento foi realizado no Laboratório de Marcadores Moleculares, da empresa Souza Cruz Ltda.

Para realizar o sequenciamento do DNA, inicialmente foram construídas bibliotecas multiplexadas usando a tecnologia de GBS (*Genotyping-by-Sequencing*) descrito por Elshire et al. (2011). A construção das bibliotecas contemplou as seguintes fases: digestão do DNA com enzima de restrição, ligação do barcode, amplificação por PCR, purificação do DNA, quantificação e determinação do tamanho dos fragmentos (Bioanalyzer®) e quantificação por RT-PCR.

O sequenciamento do DNA da população de mapeamento foi realizado a partir das bibliotecas multiplexadas utilizando o protocolo do equipamento MiSeq – Illumina®.

Os dados brutos das sequências GBS foram avaliados quanto a sua qualidade e alinhados com o genoma de referência do tabaco disponível internamente na *British American Tobacco* (BAT), utilizando a ferramenta de mapeamento Bowtie com o parâmetro “*very-sensitive-local*”, disponível no software TASSEL-GBS (GLAUBITZ et al., 2014).

Um total de 180 famílias duplo-haploides, mais os dois parentais foram genotipados, obtendo aproximadamente 2,7 milhões de SNPs. Utilizando o programa TASSEL-GBS os dados da genotipagem foram filtrados e processados para manter apenas os SNPs presentes em mais de 85 indivíduos, presentes nos dois parentais e as informações de indivíduos com mais 40% dos SNPs presentes.

Construção do mapa de ligação

A construção do mapa de ligação é uma etapa que precede a identificação de QTLs. Os SNPs foram agrupados entre os 24 grupos de ligação (GL) do tabaco, tendo como referência física o genoma do tabaco disponível internamente na BAT e publicado por Edwards et al. (2017). Mesmo com a disponibilidade da localização física das marcas moleculares, é importante a conversão em distância genética. Para isso, foi utilizado o pacote Onemap do programa R (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2007) onde a distância genética entre os SNPs foi calculada utilizando como critério de agrupamento LOD de 3,0 e frequência máxima de recombinação de 0,40, através da equação de Kosambi (1943).

Mapeamento de QTLs

Os QTLs foram mapeados com auxílio do programa Windows QTL Cartographer 2.5 (WANG; BASTEN; ZENG, 2012) através do mapeamento por marca simples, por intervalo simples e composto. O uso dessas metodologias pode garantir maior acurácia ao mapeamento. O mapa genético utilizado foi gerado pelo aplicativo Onemap conforme descrito anteriormente. Os dados fenotípicos obtidos a partir da avaliação da população DH foram as notas invertidas da severidade dos sintomas causados pela infecção com a *Ralstonia solanacearum*.

A posição, o efeito genético e a porcentagem da variação fenotípica (R^2) explicada pelos QTLs foram estabelecidas para os picos com $LOD \geq 3,0$. As regiões mapeadas foram avaliadas para identificação de genes candidatos, baseado nos domínios relacionados a proteínas de resistência à doenças presentes nas proteínas formadas pelos genes já anotados no genoma do tabaco, dentro da região de abrangência dos QTLs.

RESULTADOS

Fenotipagem

A distribuição de frequência das famílias duplo-haploides de tabaco nas classes de severidade de murcha bacteriana é apresentada na Figura 2. O padrão de distribuição evidenciou uma tendência de distribuição simétrica entre as classes fenotípicas, de forma semelhante à uma curva de distribuição normal, com classes de severidade variando de 17,5 a 74,5% de severidade. As plantas do parental tolerante (NC95) apresentaram 27,5% de severidade de murcha bacteriana, enquanto as plantas do parental suscetível (NC2326) apresentaram 52,5%.

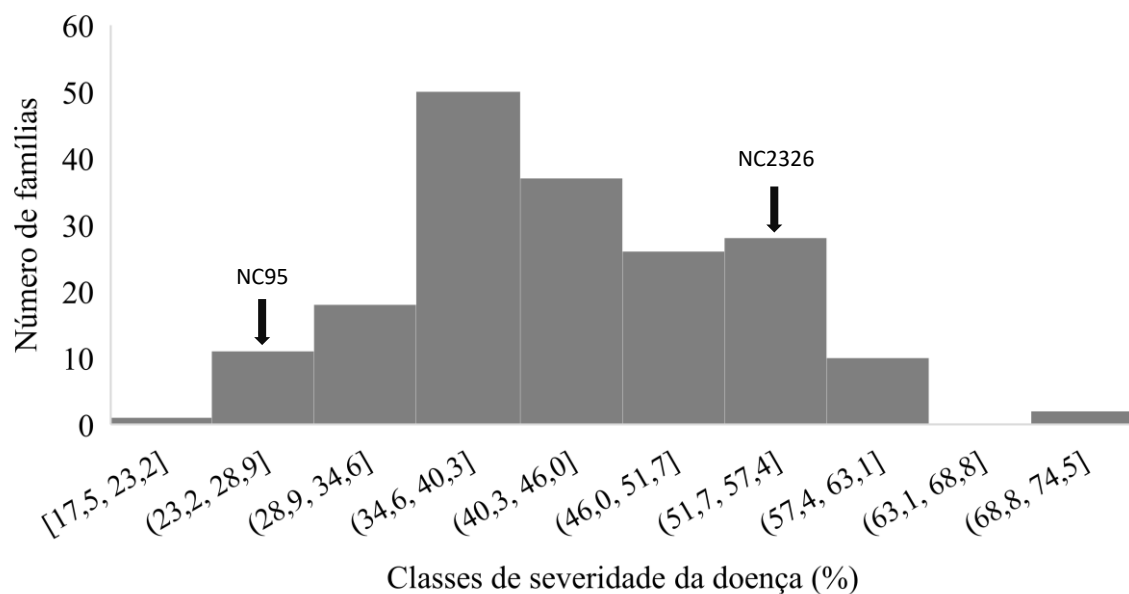


Figura 2 – Distribuição de frequência das famílias duplo-haploides de tabaco em cada classe de severidade de murcha bacteriana (%).

Mapa de ligação

Um total de 180 famílias duplo-haploides, mais os dois parentais, foram genotipados através do sequenciamento de DNA total. Após o processamento dos dados genotípicos foram obtidos aproximadamente 2,7 milhões de SNPs, os quais foram filtrados gerando 6.842 SNPs provenientes dos dados de 175 indivíduos que foram utilizados para construir um mapa de ligação com comprimento total de 70.583 cM, com distância média entre marcas de 10,3 cM. O comprimento dos grupos de ligação variou de 1.366 no GL 21 a 6.229 cM no GL 17. A distribuição dos SNPs nos grupos de ligação variou de 122 no GL 21 a 638 no GL 17 com média de 285 SNPs por GL (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultado da análise de ligação de SNPs na construção do mapa genético da população de duplo-haploides para mapeamento de QTLs para tolerância à murcha bacteriana em tabaco.

Grupo de Ligação	Número de Marcadores	Comprimento (cM)	Grupo de Ligação	Número de Marcadores	Comprimento (cM)
1	263	3996	13	285	3539
2	241	2762	14	267	2507
3	226	2540	15	292	2658
4	384	4266	16	223	2624
5	183	1816	17	638	6229
6	278	2778	18	287	2798
7	325	2975	19	230	2514
8	244	2095	20	245	2428
9	196	2177	21	122	1366
10	310	2459	22	344	3653
11	170	1942	23	325	2589
12	404	3620	24	360	4252
Total				6.842	70.583

Mapeamento de QTLs na população DH

Foram mapeados 13 QTLs distribuídos em oito dos 24 grupos de ligação (GL) (Tabela 2 e Figura 3), sendo que nos GLs 3, 17 e 22 foram detectados os QTLs com maior efeito, explicando 13,1% (GL-3), 14,4% (GL-17), 11,4; 16,5 e 14,8% (GL-22) da variação fenotípica. Dos 13 QTLs mapeados, dez evidenciaram efeito aditivo positivo, alelos de tolerância oriundos da linhagem tolerante NC95 e três apresentaram efeito aditivo negativo, ou seja, alelos de tolerância provenientes da linhagem suscetível NC2326 (Tabela 2).

Tabela 2 – Posição, LOD *score*, efeitos e proporção da variação fenotípica explicada pelos QTLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto na população de mapeamento para tolerância à murcha bacteriana em tabaco.

Grupo de Ligação	Marcador à direita	Marcador à esquerda	Posição (cM)	LOD	A	D	R ²	Genes candidatos ^a
3	SNT03_157057521	SNT03_158948204	2460	3,24	3,75	-2,18	13,1	4
4	SNT04_42655126	SNT04_47801585	1189	3,18	0,20	-6,21	2,3	5
6	SNT06_115706730	SNT06_126320878	1178	4,19	-0,43	-7,26	0,5	1
8	SNT08_93285727	SNT08_99904746	940	3,36	9,2	-5,91	9,2	1
8	SNT08_164660689	SNT08_168013938	1947	3,56	0,6	-7,57	0,6	2
12	SNT12_143261811	SNT12_143710349	2895	3,00	5,1	-7,99	5,1	2
12	SNT12_154877085	SNT12_154877103	3295	5,16	6,0	-9,93	6,0	1
17	SNT17_296380875	SNT17_299597644	5779	3,25	14,4	-5,47	14,4	5
17	SNT17_305711996	SNT17_314222739	6007	3,28	5,8	-6,12	5,8	2
21	SNT21_101521264	SNT21_101521276	1034	3,43	-0,71	-8,58	0,1	3
22	SNT22_126063	SNT22_254207	85	4,03	-4,27	1,11	14,8	1
22	SNT22_16350900	SNT22_16355635	663	4,46	3,77	-3,79	16,5	1
22	SNT22_179951481	SNT22_185333607	3233	3,76	2,84	-3,43	11,4	1

Posição em cM (Função de Kosambi) do QTL a partir do início do grupo de ligação.

LOD: LOD *score* que sustenta a posição do QTL.

R²: proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL na posição.

A: estimativa do efeito aditivo do QTL.

D: estimativa do efeito dos desvios de dominância.

^a possíveis genes de resistência a doenças em tabaco anotados na região genômica do QTL.

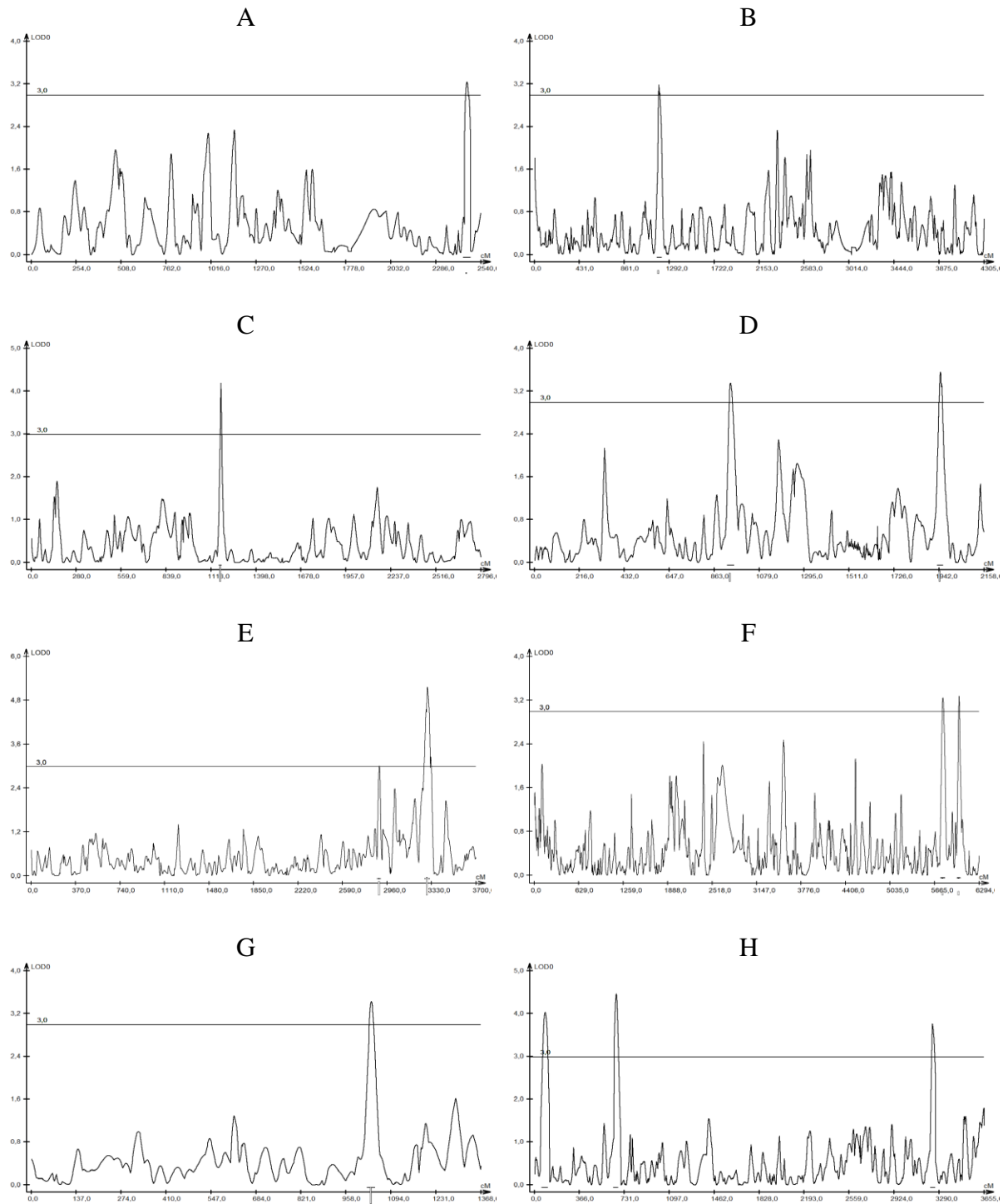


Figura 3 – Distribuição do LOD score ao longo dos grupos de ligação 3 (A), 4 (B), 6 (C), 8 (D), 12 (E), 17 (F), 21 (G) e 22 (H) onde foram mapeados QTLs para tolerância à murcha bacteriana por intervalo composto. No eixo das ordenadas é representado a distância em cM em relação ao início do grupo de ligação e no eixo das abscissas os valores de LOD score.

DISCUSSÃO

O mapeamento foi realizado utilizando 6.842 SNPs, um aproveitamento de apenas 0,25% dos 2,7 milhões de SNPs que foram gerados inicialmente no sequenciamento. O baixo índice de aproveitamento dos SNPs se deve a complexidade do genoma do tabaco que leva a uma dificuldade de alinhamento das sequências contra o genoma de referência. O genoma com alto número de repetições e duplicações, como o do tabaco, diminui consideravelmente o número SNPs úteis em uma população de mapeamento. Por outro lado, 6.842 marcadores foi 27,1 vezes maior que o número utilizado por Drake-Stowe et al. (2017), onde 252 marcadores SSR polimórficos foram utilizados para gerar o mapa de ligação, 34 vezes maior que os 201 marcadores SSR utilizados por Lan et al. (2014), 58 e 71,3 vezes maior que os dois mapas de ligação formados com 118 e 96 marcadores SSR, respectivamente, por Qian et al. (2013) e 58,5 vezes maior que os 117 marcadores AFLP utilizados por Nishi et al. (2003).

A identificação de locos mais refinados e de genes candidatos dentro destas regiões é facilitada quando um número maior de marcadores moleculares é utilizado. Quando são utilizados marcadores SSR e AFLP, no tabaco, o número de marcas é baixo, dificultando o refinamento das regiões. Entretanto, os marcadores SNP, por serem muito abundantes no genoma, favorecem o refinamento e facilitam o trabalho com um número maior de marcas.

Bindler et al. (2011) publicaram mais de 5.000 marcadores SSR e um mapa genético de alta densidade contendo 2.318 marcadores SSR, entretanto, segundo Zhang et al. (2018) o número de marcas disponíveis continua insuficiente para estudos genéticos e de melhoramento visando resistência a doenças em tabaco, o autor ressalta que o uso de marcadores SNP para construção de um mapa genético de alta densidade é uma alternativa para o estudo mais efetivo da resistência a doenças com herança quantitativa em tabaco, através do mapeamento de QTLs, devido a abundância e distribuição destes marcadores no genoma do tabaco.

O elevado número de marcas utilizadas neste trabalho possibilitou gerar um mapa de ligação de alta densidade com grande cobertura do genoma do tabaco, totalizando 70.583 cM, distribuídos em 24 grupos de ligação, bastante superior aos 2.020 cM mapeados por Drake-Stowe et al. (2017) e 2.326,7 cM por Lan et al. (2014) utilizando marcadores SSR, também distribuídos em 24 GLs, 383 cM por Nishi et al. (2003) utilizando marcadores AFLP, distribuídos em 10 GLs e ao mapa de referência para marcadores SSR publicado por Bindler et al. (2011) que possui 3.270 cM.

Xiao et al. (2015) construíram dois mapas genéticos para tabaco baseados em marcadores SNP obtidos através da metodologia RAD-seq (*Restriction-site Associated DNA*

Sequencing) que possuem 1.944,74 e 2.700,9 cM com 4.138 e 2.162 SNPs, respectivamente. Gong et al. (2016) utilizando 4.215 SNPs obtidos através da metodologia SLAF-seq (*Specific Locus-Amplified Fragment Sequencing*) construíram um mapa com 2.662,43 cM. Apesar da existência destes mapas genéticos baseados em marcadores SNP já publicados, este é o primeiro relato de um mapa genético baseado em marcadores SNP obtidos através de GBS (*Genotyping-by-Sequencing*) em tabaco, com um comprimento total de 70.583 cM e apresenta o maior número de marcas (6.842 SNPs) entre os mapas de ligação disponíveis. Este resultado representa um incremento significativo no número de marcadores disponíveis para uso em estudos genéticos e programas de melhoramento, confirmando a grande capacidade do uso de marcadores SNP para criação de mapas de ligação com alta densidade (XIAO et al., 2015). A disponibilidade de genomas sequenciados permite o avanço de técnicas como o GBS, possibilitando a transformação desta informação genética em ferramentas práticas de um programa de melhoramento.

Para o mapeamento foi utilizada uma população de 175 famílias de DH, número pouco maior que os 125 duplo-haploides utilizados por Nishi et al. (2003) e menor que as 237 linhagens F_{2:3} utilizadas por Lan et al. (2014), 236 e 264 linhagens F_{2:3} e F_{2:4} utilizados por Qian et al. (2013) e similar às 180 famílias F_{4:5} utilizadas por Drake-Stowe et al. (2017).

Em estudo de mapeamento para tolerância a murcha bacteriana com uma população constituída de famílias F_{4:5} de tabaco, provenientes do cruzamento entre K346 e TI1068, Drake-Stowe et al. (2017) encontraram três QTLs nos grupos de ligação 6, 7 e 19, onde todos os alelos favoráveis foram doados pelo parental tolerante K346. Estes QTLs explicaram 8,4, 32,1 e 5,5% da variação fenotípica da área abaixo da curva de progresso da doença para os GLs 6, 7 e 19, respectivamente. Segundo os autores os QTLs presentes nos GLs 6 e 7 estão co-localizados com QTLs relacionados à resistência ao patógeno *Phytophthora nicotianae*, demonstrado que estas regiões poderiam ser responsáveis pela resistência a múltiplas doenças. Porém, a baixa cobertura dos marcadores utilizados não permitiu chegar a genes candidatos e os autores afirmam que estudos mais aprofundados destas regiões devem ser realizados para identificar os genes envolvidos na resistência para os dois patógenos. Ma (2017) realizou o mapeamento da região correspondente ao grupo de ligação 7, porém concluiu que não está claro se esta região se trata de um loco para resistência a múltiplas doenças ou se múltiplos locos e genes estão envolvidos na resistência a estas duas doenças.

Qian et al. (2013) mapearam quatro QTLs em tabaco ligados à tolerância à murcha bacteriana nos grupos de ligação 3 e 5, que correspondem aos grupos de ligação 6 e 16, respectivamente, neste trabalho (Tabela 3). Estes QTLs explicaram 9,0 (qBWR-3a), 19,7

(qBWR-3b), 17,3 (qBWR-5a) e 17,4% (qBWR-5b) da variância fenotípica para a tolerância e estão ligados aos marcadores microssatélites PT20275 e PT30229 descritos por Bindler et al. (2007). Porém, segundo os autores, é possível que os QTLs qBWR-3a e qBWR-3b sejam o mesmo, assim como os QTLs qBWR-5a e qBWR-5b e ressaltam que a identificação de marcadores mais próximos que PT30229 e PT20275 é necessária para que se desenvolva uma estratégia de seleção assistida por marcadores mais factível (QIAN et al., 2013).

Lan et al. (2014) mapearam um QTL no GL 6 que explica 10,62% da variação fenotípica para tolerância à murcha bacteriana (Tabela 3). No presente trabalho também foi mapeado um QTL no GL 6 que explica 0,5% da variação fenotípica e a análise desta região permitiu identificar um gene candidato que poderá futuramente ser testado. Não foi possível determinar se este QTL está localizado na mesma região do grupo de ligação dos QTLs encontrados por Drake-Stowe et al. (2017), Lan et al. (2014) e Qian et al. (2013), porém a presença deste QTL reforça a importância de regiões deste grupo de ligação para tolerância à murcha bacteriana.

Lan et al. (2014) mapearam oito QTLs ligados à tolerância à murcha bacteriana nos grupos de ligação 2, 6, 12, 17 e 24 (Tabela 3). O QTL mais expressivo (qBWR17a) foi detectado no GL 17 e explicou 30% da variação fenotípica para tolerância. Neste trabalho foram mapeados dois QTLs no grupo de ligação 17 explicando 14,4 e 5,8% da variação fenotípica. Estes QTLs também estão co-localizados com QTL para resistência à *Phytophthora nicotianae* mapeado por Zhang et al. (2018), reforçando a ideia proposta por Drake-Stowe et al. (2017) de que QTLs para tolerância às duas doenças podem estar relacionados e tratando-se de locos responsáveis pela resistência a múltiplas doenças. Neste grupo de ligação foi possível elencar sete genes candidatos já anotados no genoma do tabaco que podem ser testados quanto ao seu efeito na tolerância à murcha bacteriana (Tabela 2).

Dois QTLs também foram mapeados no grupo de ligação 12 explicando 5,1 e 6,0% da variação fenotípica (Tabela 2), reforçando a importância deste GL, já mapeado por Lan et al. (2014), na tolerância à murcha bacteriana. Além disso, neste GL foram elencados três genes candidatos que podem futuramente ser testados.

No presente trabalho, diferentemente de Drake-Stowe et al. (2017), Lan et al. (2014) e Qian et al. (2013), não foram encontrados QTLs nos GLs 7, 19, 2, 24 e 16. Essa diferença de resultados pode se dever à diferença entre o isolado utilizado na inoculação e os patógenos que foram obtidos nas diferentes localidades, sugerindo assim que os QTLs dos trabalhos citados podem estar mais relacionados a uma tolerância raça-específica. Também pode estar relacionado ao uso de diferentes linhagens para formar as populações de mapeamento, as quais

podem apresentar diferentes alelos nas regiões mapeadas que contribuem para a tolerância a murcha bacteriana.

A utilização de um mapa de ligação com alta densidade de marcadores SNP e maior cobertura do genoma permitiu o mapeamento de QTLs nos grupos de ligação 3, 4, 8, 21 e 22 que não haviam sido mapeados por Drake-Stowe et al. (2017), Lan et al. (2014), Nishi et al. (2003) e Qian et al. (2013), tratando-se de QTLs inéditos e que podem contribuir para o entendimento do controle genético da tolerância à murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, em tabaco. A análise destas regiões genômicas permitiu elencar 18 genes candidatos já anotados no genoma de referência do tabaco (Tabela 2), que podem estar ligados à tolerância a doenças e futuramente podem ser testados quanto ao seu efeito na tolerância à murcha bacteriana.

O mapeamento de QTLs em grupos de ligação não relatados anteriormente reforça a importância do uso de mapas genéticos baseados em marcadores SNP com maior cobertura do genoma, pois permite o melhor entendimento do controle genético de características com herança quantitativa, como é o caso da tolerância à murcha bacteriana em tabaco (ZHANG et al., 2018). Além disso, o mapeamento de novos QTLs pode ajudar os programas de melhoramento no desenvolvimento de cultivares com altos níveis de tolerância, através da identificação de marcadores moleculares ligados a estas regiões genômicas.

Tabela 3 – Posição, LOD *score* e proporção da variação fenotípica explicada pelos QTLs mapeados em diferentes trabalhos de mapeamento para tolerância à murcha bacteriana em tabaco.

GL	NC95 x NC2326 – População DH					Drake-Stowe et al. (2017)					Lan et al. (2014)					Qian et al. (2013)				
	ME	MD	Pos	LOD	R ²	ME	MD	Pos	LOD	R ²	ME	MD	Pos	LOD	R ²	ME	MD	Pos	LOD	R ²
2											TM10851	TM10956	92,2	5,36	6,96					
3	SNT03_157057521	SNT03_158948204	2460	3,24	13,1															
4	SNT04_42655126	SNT04_47801585	1189	3,18	2,3															
6	SNT06_115706730	SNT06_126320878	1178	4,19	0,5	PT61581	PT50885	69,0	6,0	8,4	PT53345	PT61220	5	8,56	10,62	PT30229	PT1095	19,6	4,62	9,0
6																PT20306	PT30229	21,18	6,17	19,7
7						PT61472	PT52970	6,6	19,1	32,1										
8	SNT08_93285727	SNT08_99904746	940	3,36	9,2															
8	SNT08_164660689	SNT08_168013938	1947	3,56	0,6															
12	SNT12_143261811	SNT12_143710349	2895	3,00	5,1						TM11129	TME0661	5,7	7,23	7,97					
12	SNT12_154877085	SNT12_154877103	3295	5,16	6,0															
16																PT20275	PT30255	68,8	4,12	17,3
16																PT20289	PT20275	43,66	3,18	17,4
17	SNT17_296380875	SNT17_299597644	5779	3,25	14,4						TM10816	PT53442	11,4	7,08	30,39					
17	SNT17_305711996	SNT17_314222739	6007	3,28	5,8						TM10216	PT53098	118,3	6,2	12,3					
19						PT60099	PT53353	87,7	4,0	5,5										
21	SNT21_101521264	SNT21_101521276	1034	3,43	0,1															
22	SNT22_126063	SNT22_254207	85	4,03	14,8															
22	SNT22_16350900	SNT22_16355635	663	4,46	16,5															
22	SNT22_179951481	SNT22_185333607	3233	3,76	11,4															
24											PT50083	PT54204	10	4,2	3,15					
24											PT61494	PT53530	37,9	19,99	7,23					
24											PT53530	PT60792	60,73	12,77	7,0					

GL – Grupo de ligação de acordo com genoma de referência publicado por Edwards et al. (2017).

ME – Marcador à esquerda.

MD – Marcador à direita.

Pos – Posição do QTL em cM do início do grupo de ligação.

5 CONCLUSÕES

A metodologia de genotipagem por sequenciamento (GBS) na cultura do tabaco permitiu o aumento significativo no número de marcadores moleculares disponíveis para construção do mapa genético.

O uso de marcadores SNP obtidos através de GBS possibilitou a construção de um mapa de ligação de alta densidade com comprimento total de 70.583 cM e distância média entre marcas de 10,3 cM. Sendo o maior mapa de ligação utilizando marcadores SNP disponível para tabaco e com o maior número de marcas (6.842 SNPs).

Foram mapeados 13 QTLs ligados a tolerância à murcha bacteriana, distribuídos em oito grupos de ligação, dos quais oito QTLs ainda não tinham sido identificados na literatura especializada.

Os QTLs mapeados nos grupos de ligação 3, 17 e 22 apresentaram maior efeito na tolerância a murcha bacteriana do tabaco. Estudos mais aprofundados nestas regiões genômicas devem ser realizados, visando identificar possíveis genes candidatos bem como desenvolver marcadores específicos para o uso em programas de seleção assistida por marcadores moleculares.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, R. C. S.; NOVAIS, J. M. S. A competitividade internacional do tabaco do sul do Brasil: 1997-2014. **Economia & Região**, Londrina/PR, v. 4, n. 1, p. 121-138, 2016.
- BINDLER, G. et al. A microsatellite marker based linkage map of tobacco. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, n. 02, p. 341-349, 2007.
- BINDLER, G. et al. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, p. 219–230, 2011.
- BRANDLE, J. D.; BAI, D. Biotechnology: Uses and Applications in Tobacco Improvement. In: DAVIS, D. L.; NIELSEN, M. T (eds). **Tobacco: Production, Chemistry and Technology**. World Agriculture Series. Blackwell Science, 1999, p. 49-65.
- CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 64-71, 2009.
- CARMEILLE, A. et al. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phyloptype II resistance in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 110-121, 2006.
- CHEN, L. et al. Nuclear and cytoplasmic genome components of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense* somatic hybrids and three SSR alleles related to bacterial wilt resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, p. 1861–1872, 2013.
- COLOMBATTI, F.; GONZALEZ, D.; WELCHEN, E. Plant mitochondria under pathogen attack: a sigh of relief or a last breath? **Mitochondrion**, v. 19, p. 238-44, 2014.
- DRAKE-STOWE, K. et al. Multiple disease resistance loci affect soilborne disease resistance in tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Phytopathology**, v. 107, 2017, p. 1055-1061.
- EDWARDS, K. D. et. al. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. **BMC Genomics**, v. 18, n. 448, 2017.
- ELPHINSTONE, J. G. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (ed.). **Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex**. St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press, 2005, p. 9–28.
- ELSHIRE R. J. et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **Plos One**, v. 6, n. 5, p. 1-10, 2011.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina/DF: EMBRAPA Cerrados, 2007, 102 p.

- GEETHANJALI, S. et al. Development and characterization of tomato SSR markers from genomic sequences of anchored BAC clones on chromosome 6. **Euphytica**, v. 173, p. 85–97, 2010.
- GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 67–89, 2012.
- GLAUBITZ J. C. et al. TASSEL-GBS: A high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2014.
- GONÇALVES, R. C. et al. Método de inoculação de *Ralstonia solanacearum* para a seleção de plantas de *Piper hispidinervum* resistentes à murcha bacteriana. **Comunicado Técnico 185**. Embrapa Acre, Rio Branco, 2014.
- GONG, D. et al. Construction of a high-density SNP genetic map in flue-cured tobacco based on SLAF-seq. **Molecular Breeding**, v. 36, n. 100, 12 p., 2016.
- HARPER, S. Economic and social implications of aging societies. **Science**, v. 346, p. 587-591, 2014.
- HONG, J. C. et al. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. **Phytopathology**, v. 102, p. 924-936, 2012.
- HORN, M. E.; WOODARD, S. L.; HOWARD, J. A. Plant molecular farming: systems and products. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 711–720, 2004.
- HUET, G. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 715, p. 1-5, 2014.
- JACK, A. The CORESTA collaborative study on bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) – **2001 report**, 2001. Disponível em: <https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/BacterialWilt-Report2001_0.pdf>. Acesso em 02 mar. 2017.
- JACK, A. The CORESTA collaborative study on bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) – **2002 report**. 2002. Disponível em: <https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/BacterialWilt-Report2002_0.pdf>. Acesso em 02 mar. 2017.
- JACOBS, M. **From the first to the last ash: The History, Economics & Hazards of Tobacco**. 1997. Disponível em: <<http://healthliteracy.worlded.org/docs/tobacco/Tobacco.pdf>>. Acesso em 21 jan. 2017.
- JONES, E. S. et al. A comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 115, p.361-371, 2007.
- KATAWCZIK, M., TSENG, H. T., MILA, A. L. Diversity of *Ralstonia solanacearum* populations affecting tobacco crops in North Carolina. **Tobacco Science**, 53:1-11. 2016.
- KIBA, A. et al. Isolation and expression analysis of candidate genes related to *Ralstonia solanacearum*–tobacco interaction. **Plant Biotechnology**, v. 24, p. 409–416, 2007.

- KIM, B. S. et al. Bacterial wilt disease: host resistance and pathogen virulence mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 95, p. 37-43, 2016.
- KIST, B. B. et al. **Anuário brasileiro do tabaco 2016**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta. 128 p. 2016.
- KOSAMKI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, v. 12, p. 172–175, 1943.
- LAN, L. et al. Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to bacterial wilt in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Plant Breeding**, v. 133, p. 672–677, 2014.
- LEBEAU, A. et al. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, p.143–158, 2013.
- LEGG, P. D.; SMEETON, B. W. Breeding and Genetics. In: DAVIS, D. L.; NIELSEN, M. T (eds). **Tobacco: Production, Chemistry and Technology**. World Agriculture Series. Blackwell Science, 1999, p. 32-48.
- LEITCH, I. J. et al. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). **Annals of Botany**, v. 101, p. 805–814, 2008.
- LIU, Y. et al. The sequevar distribution of *Ralstonia solanacearum* in tobacco-growing zones of China is structured by elevation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, n. 3, p. 541–551, 2017.
- MA, J. M. Y. The fine mapping of two black shank resistance loci and identification of a hybrid lethality gene in tobacco. Ph.D. dissertation, North Carolina State University. 2017. 160 p.
- MAIMBO, M. et al. S-glycoprotein-like protein regulates defense responses in *Nicotiana* plants against *Ralstonia solanacearum*. **Plant Physiology**, v. 152, p. 2023–2035, 2010.
- MAMMADOV, J. et al. SNP Markers and their impact on plant breeding. Review Article. **International Journal of Plant Genomics**. Article ID 728398, 2012, 11 p.
- MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, v. 144, n. 3, p. 78-79, 2007.
- MENDES, L. et al. **Anuário brasileiro do tabaco 2015**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta. 2015. 128p.
- NISHI, T. et al. Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 765–770, 2003.
- PEEDIN, G. F. Production Practices: Flue-cured Tobacco. In: DAVIS, D. L.; NIELSEN, M. T (eds). **Tobacco: Production, Chemistry and Technology**. World Agriculture Series. Blackwell Science, 1999, p. 104-142.
- PEEDIN, G. F. Tobacco cultivation. In: MYERS, M. L. (ed.). **Specialty Crops**. International Labor Organization, 2011. Disponível em: <<http://www.iloencyclopaedia.org/part-x->

96841/agriculture-and-natural-resources-based-industries/specialty-crops>. Acesso em 02 mar. 2017.

QIAN, Y. et al. The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco (*N. tabacum* L.). **Euphytica**, v. 192, p. 259–266, 2013.

QIAN, Y. L. et al. Genetic analyses of the major and minor locus groups of bacterial wilt resistance in tobacco using a diallel cross design. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016.

RANDALL, V. R. **History of Tobacco**. Boston University Medical Center. 1999. Disponível em: < <http://academic.udayton.edu/health/syllabi/tobacco/history.htm>>. Acesso em 21 jan. 2017.

RATOCHINSKI, C. M. W. **Agricultura familiar**: um estudo da saúde do produtor de tabaco. 2015, 102 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) – Universidade do Contestado, Canoinhas, 2015.

SANTIAGO, T. R. et al. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**, p. 1-10, 2016.

SANTOS, C. E. et al. **Anuário brasileiro do tabaco 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta. 128 p. 2017.

SIERRO, N. et. al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature Communications**, v. 5, n. 3833, 2014.

SILVEIRA, R. L. L. Rede e território: reflexões sobre a rede agroindustrial do tabaco, circuito espacial de produção e círculos de cooperação na região sul do Brasil. **Caderno de Geografia**, v. 26, n. 47, 2016.

SILVEIRA, R. L. L.; DORNELLES, M.; FERRARI, S. Expansão da cultura do tabaco no sul do Brasil (1996-2006): características, mudanças e persistências na produção de tabaco e nos usos do território. **Revista Bibliográfica de Geografía y Ciencias Sociales**. Universidad de Barcelona. v. XVII, n. 987, 2012.

SINDITABACO, 2016. **Origem do tabaco**. Disponível em: <<http://sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/origem-do-tabaco/>>. Acesso em 27 dez. 2016.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV, 2004. 568 p.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistance. **Plant Physiology**, v. 125, p. 73–76, 2001.

TSO, T. C. Seed to smoke. In: DAVIS, D. L.; NIELSEN, M. T (eds). **Tobacco: Production, Chemistry and Technology**. World Agriculture Series. Blackwell Science, 1999, p. 1-31.

VIANA, F. C.; BERGER, I. J.; DUARTE, V. Caracterização de populações de *Ralstonia solanacearum* Smith em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 2, p. 123-129, 2012.

VIEIRA, E. A. et al. **Mapeamento genético de caracteres quantitativos e sua interação com o ambiente**. Documento 170, Embrapa Cerrados, 2006. 28p.

XIAO, B. et al. SNP-based genetic linkage map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using next-generation RAD sequencing. **Journal of Biological Research**, v. 22, 11 p., 2015.

WANG, J. F. et al. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar ‘Hawaii 7996’ to *Ralstonia solanacearum*. **Euphytica**, v. 190, p. 241–252, 2013.

WANG, S.; BASTEN, C. J.; ZENG, Z. B. **Windows QTL Cartographer 2.5**. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, 2012. Disponível em: <<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

YULIAR; NION, Y. A.; TOYOTA, K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2015.

ZHANG, Y. et al. Identification of stably expressed QTL for resistance to black shank disease in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) line Beinhart 1000-1. **The Crop Journal**, v. 6, n. 3, p. 282–290, 2018.