



DANILO GUSTAVO NOGUEIRA

**MARCADOR MICROSSATÉLITE ASSOCIADO
AO ALELO *Ty-1* QUE CONFERE RESISTÊNCIA
A BEGOMOVÍRUS EM TOMATE**

LAVRAS – MG

2010

DANILO GUSTAVO NOGUEIRA

**MARCADOR MICROSSATÉLITE ASSOCIADO AO ALELO *Ty-1* QUE
CONFERE RESISTÊNCIA A BEGOMOVÍRUS EM TOMATE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Wilson Roberto Maluf

LAVRAS - MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Nogueira, Danilo Gustavo.

Marcador microssatélite associado ao alelo *Ty-1* que confere
resistência a begomovírus em tomate / Danilo Gustavo Nogueira. –
Lavras : UFLA, 2010.

54 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Wilson Roberto Maluf.

Bibliografia.

1. Mosca-branca. 2. Doença. 3. Geminivírus. 4. Marcadores
moleculares. 5. Melhoramento genético de plantas. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

DANILO GUSTAVO NOGUEIRA

**MARCADOR MICROSSATÉLITE ASSOCIADO AO ALELO *Ty-1* QUE
CONFERE RESISTÊNCIA A BEGOMOVÍRUS EM TOMATE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de agosto de 2010.

Dra. Luciane Vilela Resende UFLA

Dr. João Bosco dos Santos UFLA

Dr. Wilson Roberto Maluf
Orientador

LAVRAS – MG

2010

Aos meus pais,
Maurício Veloso Nogueira e Eliana Rita Nogueira,
pelo carinho e atenção durante toda minha vida.

Aos meus irmãos,
Douglas e Artur pela compreensão,
e a todos os meus queridos amigos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial aos Departamentos de Biologia, Fitopatologia e Fitotecnia.

Ao Prof. Wilson Roberto Maluf pela oportunidade e orientação no desenvolvimento do trabalho.

Ao Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA, Douglas Willian Nogueira, pelo conhecimento transmitido e ajuda durante todas as etapas dessa pesquisa.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Hortiagro pelos recursos financeiros e pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos técnicos Paulo Moretto e Vicente Licursi pelo apoio e grande amizade.

Ao funcionário Ná.

Aos meus amigos Ranoel, Fernando, Régis, Álvaro, Gabriel, Romário, Lidiane, Isabel, Monik, Francinelly, Gleice, Tathi, Jeferson, Rafael, Pablo, César Peruano, Irwin pelo companheirismo.

A querida empregada Nair.

Aos amigos que ficaram em Itajubá, Júlio, Neide, Camila, Lúcia, Marcelo, Velma, Edirlei, Ana Paula, Rodrigo, Isabella, Aline, Maia, Renato, Liliane, Luciana pelos momentos de descontração.

Aos meus queridos tios Ivo, Marquinho, Zeti, Léo.

Em fim a todos que contribuíram de certa forma para esta conquista.

RESUMO

A cultura do tomateiro é atacada por inúmeras pragas e doenças. Em relação às pragas, a mosca-branca (*Bemisia spp.*), vem sendo considerada uma das mais importantes pragas da cultura, pelo fato de ser vetor de geminivíroses. Entre as geminivíroses, as causadas por espécies do gênero *Begomovirus* estão entre as de maior importância econômica. Um dos métodos mais promissores para o controle da doença é o uso de cultivares resistentes, entretanto, poucas fontes de resistência vem sendo utilizadas no desenvolvimento de cultivares comerciais, predominando em cultivares comerciais resistentes o uso do alelo de resistência *Ty-1*. O objetivo do trabalho foi verificar a associação de um marcador microssatélite ao alelo *Ty-1* que confere resistência a begomovírus em tomate, e comprovar sua eficiência na seleção de linhagens resistentes ao vírus. Os marcadores SSR-47 e SSR-48 foram testados em linhagens isogênicas contrastantes para a presença do alelo *Ty-1*. O marcador SSR-47 por apresentar polimorfismo, foi o único utilizado nas demais etapas do trabalho. Detectada preliminarmente a associação entre o marcador SSR-47 e o alelo *Ty-1*, testou-se sua eficiência na seleção de genótipos avançados de tomateiro. Para confirmar a eficiência da seleção foi realizada avaliação fenotípica das plantas com padrões contrastantes de bandas para SSR-47 quanto à resistência a begomovírus. Todas as plantas com banda de 191 pb apenas foram consideradas resistentes ao begomovírus pelo teste de inoculação por enxertia, e todas as com banda de 180 pb apenas foram suscetíveis; plantas com as 2 bandas também se apresentaram como resistentes. A infecção do begomovírus, induzida via enxertia, manifestou, nos genótipos testados, sintomas condizentes com os resultados obtidos com o marcador molecular SSR-47. A distância máxima estimada entre o gene de resistência a begomovírus *Ty-1* e o marcador SSR-47 foi de 2,7 cM, sendo este marcador considerado eficiente em caracterizar genótipos portadores do alelo *Ty-1*.

Palavras-chave: Begomovírus. Mosca-branca. Resistência. Marcador microssatélite.

ABSTRACT

The tomato crop is plagued by many pests and diseases. Whiteflies (*Bemisia* spp.) are considered a major tomato pest because of their action as a vector of geminivirus diseases. Geminivirus diseases caused by species of the genus *Begomovirus* are of major economic significance. Resistant cultivars are the most promising means of disease control, but few resistance sources have been deployed in the development of begomovirus resistant cultivars. The most widely deployed resistance source available in commercial hybrids is the resistance allele *Ty-1*. The objective of this work was to associate a microsatellite marker to the *Ty-1* allele, and to verify its efficiency in the selection of begomovirus resistant lines. The microsatellite markers SSR-47 and SSR-48 were initially tested in isogenic lines with contrasting genotypes for the presence of the *Ty-1* allele. The SSR-47 was polymorphic, and was the only marker used subsequently. The association between SSR-47 and the *Ty-1* allele was further tested in the selection of advanced tomato genotypes. In order to test the efficiency of the selection, plants with contrasting band patterns were tested for their reaction to begomovirus. All plants with a single 191 bp band were found to be begomovirus resistant following a graft inoculation with the virus, and all plants with a single 180 bp band were found to be susceptible. Plants with both bands were also rated as resistant. Reaction of plants to begomovirus infection was consistent with the results expected from selection with the SSR-47 marker. The maximum estimated distance between the begomovirus resistant allele *Ty-1* and the SSR-47 marker was 2,7 cM, and the marker was therefore considered efficient as a tool for selection for begomovirus resistance.

Keywords: Begomovirus. Whitefly. Resistance. Microsatellite marker.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Padrão eletroforético de fragmentos de DNA amplificados para o marcador SSR-47 e SSR-48 em plantas de tomateiro; 1- LA- 3474, suscetível a begomovírus (isogênico a LA-3475); 2- LA-3473, resistente a begomovírus (isogênico a LA-3475); 3- LA-3475, suscetível a begomovírus 53
- Figura 2 Padrão eletroforético de fragmentos de DNA amplificados para o marcador SSR-47 em plantas de tomateiro; 1- Ladder (100 pb); 2- TEX-143 Pl#01; 3- LA-3474 Pl#01; 4- LA-3473 Pl#01; 5- BPX-373G-06-02-01 Pl#01; 6- BPX-373G-06-10-01 Pl#01; 7- BPX-373G-07-03-03 Pl#01; 8- BPX-374G-01-01-03 Pl#01; 9- BPX-374G-01-02-03 Pl#01; 10- TEX-143 Pl#02; 11- LA-3475 Pl#01; 12- LA-3473 Pl#02; 13- BPX-374G-04-08-02 Pl#01; 14- BPX-374G-04-12-01 Pl#01; 15- BPX-375F-04-01-02 Pl#01; 16- BPX-375F-04-08-04 Pl#01 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Resultado do padrão eletroforético utilizando o marcador molecular SSR-47 em famílias avançadas de tomateiro. Lavras, UFLA, 2009 ... 51
- Tabela 2 Descrição dos tratamentos, reação fenotípica e resultado do padrão eletroforético utilizando o marcador molecular SSR-47 52

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	25
	REFERÊNCIAS.....	26
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO.....	31
	ARTIGO 1 Marcador microssatélite associado ao alelo <i>Ty-1</i> que confere resistência a begomovírus em tomate.....	31

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro é atacada por inúmeras pragas e doenças, cujo controle químico representa cerca de 30% do custo total da produção (EMPRESA BRASILEIRA EM AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2009). Em relação às pragas, a mosca-branca (*Bemisia spp.*) vem sendo considerada uma das mais importantes pragas da cultura, não somente pelo dano direto causado pelo inseto, mas pelo fato de ser vetor de geminivíroses (EMBRAPA, 2009). Entre as geminivíroses, as causadas por espécies do gênero *Begomovirus* estão entre as de maior importância econômica, devido à sua alta incidência e severidade em áreas tropicais e subtropicais do mundo.

No Brasil, o primeiro relato de geminivírus infectando tomateiro foi feito por Costa, Oliveira e Silva (1977), que estudaram a transmissão do mosaico dourado pela mosca-branca (*B. tabaci*), que era uma das seis viroses do tomateiro reconhecidas presentemente na época. Hoje, a crescente incidência de geminivírus está associada à introdução de uma nova espécie/biótipo do inseto vetor, espécie *B. argentifolii*, também conhecida de *B. tabaci* = biótipo B ou chamada comumente de “mosca-branca da folha prateada” (EMBRAPA, 2009), e da ocorrência de plantas daninhas hospedeiras de vetores e do vírus (AMBROZEVICIUS, 2000).

O biótipo B se disseminou rapidamente por todas as regiões quentes e secas do Brasil, incluindo as principais regiões produtoras de tomate. Simultaneamente sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiros foram relatados no Distrito Federal, Triângulo Mineiro, São Paulo, Rio de Janeiro e na região Nordeste (LIMA et al., 2001). A caracterização preliminar das espécies de begomovírus associadas a alguns desses relatos, levaram a descrição de cinco novas espécies:

Tomato rugose mosaic virus (ToRMV) (FERNANDES et al., 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (RIBEIRO et al., 2007), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (CALEGARIO et al., 2007), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (FERNANDES et al., 2008). Além dessas espécies, pelo menos doze espécies provisórias, ainda não totalmente caracterizadas, foram descritas (FAUQUET et al., 2008).

Em campo a disseminação do vírus é controlada por meio do controle químico da mosca-branca, entretanto esse procedimento não é totalmente eficaz, em função do aparecimento de populações resistentes (GERLING, 1990) e pelo fato da doença ser diagnosticada em estádios avançados, na maioria das vezes (EMBRAPA, 2009). Um dos métodos mais promissores para o controle da doença é o uso de cultivares resistentes (MATOS et al., 2003), entretanto, poucas fontes de resistência vindo sendo utilizadas no desenvolvimento de cultivares comerciais, e dessas as mais promissoras possuem o alelo *Ty-1*, proveniente do acesso selvagem *Solanum chilense* (GIORDANO et al., 2005; MARUTHI et al., 2003; SANTANA et al., 2001).

O alelo que confere resistência a begomovírus (*Ty-1*), foi mapeado por Zamir et al., (1994) no cromossomo 6 próximo à região do centrômero, intimamente ligado (< 1 cM) ao alelo *Mi* que confere resistência a nematóides de galhas (*Meloidogyne* spp.), porém em fase de repulsão. Portanto, linhagens cuja resistência a begomovírus é conferida pelo alelo *Ty-1* são presumivelmente suscetíveis a nematóides (Mi^+).

As poucas cultivares hoje disponíveis no mercado foram obtidas por meio do melhoramento convencional. Para isso, foram realizados vários cruzamentos e posterior fenotipagem dos indivíduos obtidos por meio de inoculações, normalmente em casa-de-vegetação ou em campo infestado, sendo por isso um trabalho laborioso e na maioria das vezes de pouca eficiência, devido às possibilidades de escapes, o que pode ser em parte, a possível explicação do elevado nível de incidência de

plantas com sintomas da doença nos plantios realizados com tais cultivares (EL MEHRACH et al., 2009).

Atualmente a identificação de marcadores moleculares ligados a alelos de resistência a doenças é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento em andamento no mundo para a cultura do tomateiro (BARONE, 2009). Destas doenças, as de natureza viróticas são as principais devido à dificuldade de fenotipagem e seleção dos indivíduos desejados (EL MEHRACH et al., 2009; MENEZES et al., 2004).

Vários são os tipos de marcadores moleculares associados a alelos de resistência à doença. Entre eles destacam-se os microssatélites que possuem herança codominante (RITSCHER et al., 2002). Mais de 40 alelos que conferem resistência a algumas das principais doenças do tomateiro estão associados a marcadores moleculares e estão disponíveis na literatura (BARONE, 2009). Mais de 600 primers de microssatélite já foram descritos para o tomateiro (embora sua maioria ainda não mapeados), apresentando por isso um grande potencial de serem utilizados como candidatos a marcadores associados a genes que contêm alelos de resistência à doença. Informações sobre esses marcadores estão disponíveis na internet na página do Sol Genomics Network (2010).

O objetivo do presente trabalho foi o de associar um marcador de microssatélite ao alelo *Ty-1* que confere resistência ao begomovírus em tomate, e comprovar sua eficiência na seleção de linhagens resistentes ao vírus.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem e importância econômica do tomateiro

O tomate (*Solanum lycopersicum*, sin. *Lycopersicon esculentum*) é uma hortaliça originária da parte ocidental da América do Sul, que foi levada para a América Central por índios pré-históricos e para outras partes do mundo por viajantes europeus, no século XV. O centro de origem primário do tomateiro é um território limitado ao norte pelo Equador, ao sul pelo Chile, ao oeste pelo Oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes. No período anterior à colonização espanhola foi levado para o México onde foi cultivado e melhorado. Foi introduzido na Europa através da Espanha, onde inicialmente foi usado como planta ornamental, por ser considerado tóxico para ser usado na alimentação. Foi classificado por Lineu no gênero *Solanum*. Em 1788 Miller designou de *Solanum lycopersicum* o tomate cultivado, espécie cosmopolita que se originou da espécie andina *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, que produz frutos do tipo cereja e de *S. pimpinellifolium* o tomate selvagem (MELO; RIBEIRO, 1990).

Atualmente, o tomate é cultivado em praticamente todas as regiões geográficas do Brasil, e é a segunda hortaliça em importância econômica, plantado sob diferentes sistemas de cultivo e diferentes níveis de manejo cultural, podendo seus frutos ser consumidos na forma *in natura* ou então industrializados. No ano de 2008, foram cultivados no Brasil cerca de 62,2 mil hectares de tomate, com uma produção média anual estimada em aproximadamente 3,9 milhões de toneladas e um rendimento médio de 63,4 t/ha (FAOSTAT, 2010). Atualmente a região Centro-Oeste é a maior produtora de tomate para a indústria. Por outro lado, a região Sudeste ainda continua sendo a maior produtora de tomate para consumo *in natura*, sendo os estados de São Paulo e Minas Gerais os maiores

produtores (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009). Nessas regiões, a importância da cultura do tomate é crescente, pois além do aspecto econômico, o cultivo do tomateiro é uma atividade de grande importância social como fonte geradora de empregos tanto na área rural como na urbana.

O maior produtor mundial de tomate é a China (26,08%), seguida pelos EUA (9,69%), Turquia (8,47%), Índia (7,91%), Itália (4,60%), Irã (3,90%) e Egito (3,20%). O Brasil é o oitavo maior produtor mundial (3,03%), e o sexto em produtividade, com rendimento médio de 63,4 t/ha (FAOSTAT, 2010).

Apesar de o tomateiro ser uma das mais importantes hortaliças cultivadas no mundo (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2005), é uma planta que apresenta vários problemas fitossanitários (SUINAGA et al., 2003). Entre as doenças, as de natureza virótica são as mais danosas em decorrência dos estragos que podem causar e da dificuldade na diagnose e controle. Por essas particularidades, as doenças viróticas, especialmente as geminivirose, representam um dos problemas mais difíceis de serem afrontados pelos produtores, devido ao fato do controle utilizando práticas agrícolas convencionais frequentemente não ser eficiente no controle dessas doenças.

2.2 Doenças viróticas e geminivírus

Dos agentes fitopatogênicos, os vírus ocupam um lugar à parte, pois são parasitas intracelulares obrigatórios, com capacidade de multiplicar-se somente em células vivas de organismos superiores. Para garantir a própria multiplicação utilizam o metabolismo das células do hospedeiro. Os vírus são constituídos por uma população de indivíduos semelhantes na forma, nas dimensões, na estrutura e na composição química (COLARICCIO,

2009). Uma vez estabelecido no interior da célula hospedeira de uma planta suscetível, a recuperação da mesma é praticamente impossível.

No Brasil já foram identificadas diferentes viroses limitantes para a cultura do tomate, principalmente as espécies de vírus pertencentes aos gêneros *Tospovirus*, *Begomovirus*, *Tobamovirus* e *Potyvirus*, que podem ocorrer isoladamente ou em infecções mistas, que podem suceder-se na cultura a cada ano, causando por isso, graves epidemias.

Para algumas dessas viroses o uso de medidas de controle convencionais, tais como rotação de culturas, detecção inicial, destruição de plantas infectadas e controle químico dos vetores, constitui-se na principal medida para amenizar as perdas ocasionadas pelas infecções virais. No caso do vira-cabeça do tomateiro (TSWV), causado por vírus do gênero *Tospovirus*, e das doenças causadas por vírus do gênero *Begomovirus*, tais medidas não têm sido eficientes (EMBRAPA, 2009). Isso se deve ao seu imenso círculo de hospedeiros, especificidade e eficiência dos vetores na transmissão do vírus, e uso de cultivares suscetíveis. Tal situação faz com que a resistência genética associada às práticas comuns de prevenção de vírus se mostre como a única estratégia viável no controle dessas doenças no tomate, tanto para o caso do segmento *in natura* como para o processamento, pois em ambos os casos os vetores estão presentes em altas populações no campo durante todo o ano.

A primeira descrição de geminivírus no Brasil foi a do causador do mosaico dourado do tomateiro, *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), transmitido pela mosca-branca, e ocorreu em 1974. Recentemente, novos isolados, causando sintomas mais severos do que o TGMV foram descritos na região de São Joaquim de Bicas, Minas Gerais; inicialmente denominado TGV-[Bi2], após caracterização molecular constituiu uma nova espécie de begomovírus, denominada *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (CALEGARIO et

al., 2007). Também foram identificados as espécies *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (FERNANDES et al., 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (RIBEIRO et al., 2007), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (FERNANDES et al., 2008).

O alto grau de severidade dessas doenças, a relativa inexistência de fontes de resistência genética na espécie cultivada de tomateiro, a ampla gama de hospedeiros (incluindo plantas daninhas e silvestres) e a disponibilidade de poucas informações referente às espécies encontradas no país, têm contribuído para que as doenças provocadas por geminivírus sejam consideradas as principais doenças viróticas do tomateiro (COLARICCIO, 2009).

2.3 Aspectos gerais dos geminivírus

A família *Geminiviridae* é caracterizada por possuir material genético composto por DNA de fitas simples (ssDNA), circular, encapsidado por uma única proteína estrutural que confere a partícula uma morfologia icosaédrica geminada. A família é composta pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e organização genômica (STANLEY et al., 2005).

As espécies incluídas no gênero *Begomovirus* apresentam de um a dois componentes genômicos e são transmitidas por moscas-brancas (*Bemisia* spp.) para espécies dicotiledôneas. Atualmente é considerado como o gênero mais importante, devido aos prejuízos provocados nas espécies cultivadas de grande importância econômica em todo o mundo (SAWANGJIT et al., 2005). Nas espécies com genoma bipartido, a organização genômica é feita em dois componentes denominados de

genoma A e B, contendo cerca de seis genes. Cada componente de aproximadamente 2,6 kb é encapsidado separadamente em partículas geminadas, sendo necessárias as duas partículas para que ocorra a infecção. Os componentes, designados DNA A e DNA B, são similares no tamanho, mas diferem na homologia de sequência, exceto por uma Região Comum (RC) de 200 a 250 pb, que é quase idêntica nos dois componentes (PILARTZ; JESKE, 2003). Os componentes de um mesmo vírus apresentam homologia >95% na região comum, porém esta região não é conservada entre componentes de diferentes vírus, sendo por isso utilizada em estudos filogenéticos. Na RC encontram-se sinais para reconhecimento de processos comuns a ambos os genomas (replicação, iniciação de transcrição e encapsidação) (PILARTZ; JESKE, 2003).

2.4 Mosca-branca

Tem sido crescente e notório a ocorrência de moscas-brancas na cultura do tomateiro, preocupando produtores e pesquisadores devido aos prejuízos causados pelas viroses por elas transmitidas. Sua distribuição está relacionada à expansão da monocultura, às condições de sistemas agrícolas modernos, aumento da utilização de agrotóxicos e sua adaptação em diversos tipos de hospedeiros (BROWN; FROHLICH; ROSELL, 1995).

Em tomateiro, os danos provocados pela mosca-branca, variam conforme a espécie. Além dos sintomas indiretos provocados pelo ataque de viroses, o ato de sugar as plantas para obtenção da seiva leva ao aparecimento de sintomas externos, caracterizados pelo amadurecimento irregular dos frutos, e internos, onde os frutos apresentam-se esbranquiçados com aspecto esponjoso ou isoporizados, depreciando a qualidade do fruto e, conseqüentemente, o rendimento da cultura.

Entretanto, o dano mais sério causado pelo inseto é por ser vetor de várias viroses com sintomatologia variada (OLIVEIRA, 2001).

A associação da transmissão de doenças viróticas com mosca-branca foi feita primeiramente no feijão e em seguida no tomateiro na década de 1970 (COSTA; OLIVEIRA; SILVA, 1977). A partir daí o aumento populacional de *B. tabaci* foi determinante para a disseminação do TGMV no feijão, mas não no mesmo nível do que na cultura do tomate (OLIVEIRA; HENNEBERRY; ANDERSON, 2001).

Mais de uma década se passou sem que fosse relatada a presença de geminivírus em tomate. Porém em 1994, no Distrito Federal, foi relatada a ocorrência de uma nova espécie de geminivírus, que rapidamente se disseminou por toda a região causando perdas de 40 a 100% no ano seguinte (BEZERRA et al., 1996). Esse reaparecimento ocorreu após relatos da nova espécie de mosca-branca (*B. argentifolii* = *B. tabaci*/ biótipo B) associada a tomateiros. O biótipo B diferencia-se dos demais por apresentar maior fecundidade, maior número de hospedeiros, resistência a vários inseticidas e capacidade de induzir anomalias fisiológicas às plantas, tais como, o prateamento-das-folhas de cucurbitáceas e o amadurecimento irregular de frutos do tomateiro, que são anomalias causadas por nenhum outro biótipo. Com a expansão de culturas como a soja e o feijão, as moscas-brancas e a ocorrência de geminivírus se espalharam para outras regiões onde também se cultiva o tomateiro, como São Paulo, Minas Gerais, Goiás e regiões do Nordeste e Norte (COLARICCIO et al., 2003; COLARICCIO, 2009).

2.5 Fontes de resistência genética a geminivírus

O controle das doenças viróticas está associado a um conjunto de medidas preventivas, que na maioria das vezes não são eficientes. No caso

específico de geminivírus, as medidas mais eficientes estão na erradicação dos insetos vetores ou ainda na utilização da resistência genética, para tornar as plantas resistentes ao vírus, impedindo ou dificultando que a doença se instale (MARUTHI et al., 2003; COLARICCIO, 2009).

Os trabalhos desenvolvidos para selecionar fontes de resistência a geminivírus em outros países, têm usado isolados de “*Tomato yellow leaf curl virus*” (TYLCV) de genoma monopartido durante o processo de seleção (ACCOTTO et al., 2000). Genótipos selecionados como resistentes ao TYLCV monopartido têm apresentado níveis satisfatórios de resistência aos isolados de geminivírus com genoma bipartido do Brasil (MATOS et al., 2003) e esses têm sido utilizados como fonte de resistência genética a geminivírus em condições brasileiras.

Alto nível de resistência ao TYLCV foi encontrado em *S. chilense* (SANTANA et al., 2001), sendo a resistência condicionada pelo alelo *Ty-1*, com dominância parcial (GÓMEZ et al., 2004). Algumas linhagens foram desenvolvidas, e atualmente, muitos eventos de introgressão gênica do alelo *Ty-1* em cultivares comerciais vêm sendo realizados em todo mundo (GÓMEZ et al., 2004). Uma vez que genótipos selecionados com esse alelo têm apresentado níveis satisfatórios de resistência ao isolado de geminivírus com genoma bipartido do Brasil e monopartido de outros países, o alelo *Ty-1* tem sido a fonte de resistência genética mais promissora (EL MEHRACH et al., 2009; GÓMEZ et al., 2004; MATOS et al., 2003).

Pesquisas têm demonstrado que o alelo *Ty-1* interfere na proteína viral responsável pela circulação do vírus (movimento célula-a-célula), diminuindo assim o acúmulo do vírus na planta e conseqüentemente o transporte a longa distância (LATERROT, 1995). Apesar desse potencial, a resistência derivada de *S. chilense* é ainda pouco explorada em decorrência

principalmente das dificuldades nas avaliações e seleções fenotípicas (EL MEHRACH et al., 2009; GÓMEZ et al., 2004).

A identificação de marcadores moleculares associados a alelos de resistência à geminivírus pode contribuir para estabelecer melhores estratégias de melhoramento e seleção de genótipos resistentes, visto que a sintomatologia na maioria das vezes é um parâmetro insuficiente para diferenciar os genótipos desejáveis.

2.6 Métodos de avaliação de resistência a begomovírus

Atualmente, diversos métodos são utilizados na avaliação de resistência a begomovírus, incluindo métodos tradicionais e técnicas biotecnológicas. Para a avaliação da resistência/suscetibilidade as plantas são inoculadas com o vírus. Vários são os métodos de inoculação de viroses em geral, entre eles a mecânica, onde folhas jovens de tomateiro infectadas são trituradas em almofariz na presença de tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5 acrescido de Na_2SO_3 a 0,1%, na proporção 1:2 (p/v). O extrato obtido é friccionado com gaze na superfície adaxial das folhas polvilhadas com carborundum. Após a inoculação, as folhas são lavadas com água corrente e as plantas mantidas em casa de vegetação. No entanto, a infecção sistêmica de begomovírus em tomateiro por inoculação mecânica é esporádica, não sendo um método confiável para seleção de plantas resistentes (SANTOS et al., 2004).

Os insetos vetores também podem ser empregados na transmissão de begomovirus. Moscas-brancas, em grupos de 15 a 25 insetos, provenientes de colônias avirulíferas, são submetidas a um período de acesso de aquisição do vírus de 72 h em tomateiro infectado, sendo, em seguida, confinadas às mudas sadias em gaiolas revestidas com telas contra insetos. As moscas-brancas são mantidas nas plantas por um período de acesso de inoculação de 48 h após o

qual, as plantas são pulverizadas com inseticida sistêmico e transferidas para casa de vegetação. (SANTOS et al., 2004).

Para a transmissão por enxertia, brotações ou seções de ramos novos de tomateiros infectados são enxertadas em tomateiros sadios, no estágio de quarta folha verdadeira. As avaliações para suscetibilidade/resistência em ambos os métodos de inoculação é feita levando-se em consideração os sintomas nas brotações novas, empregando-se uma escala de notas de 1 a 5, adaptada de Lourenção et al., (2004), em que: 1= ausência de sintomas; 2= maioria das folhas com sintomas brandos - como leve mosaico e leve rugosidade; 3= algumas folhas com rugose nítida, e sintomas variando de clorose, em até 50% da área foliar, a leves deformações nas folhas; 4= maioria das folhas com rugosidade severa, clorose acima de 50% da área foliar e folhas deformadas; 5= folhas com rugosidade severa, enrolamento das folhas, encarquilhamento, clorose e deformações severas.

As técnicas moleculares mais utilizadas na detecção e identificação de geminivírus em plantas têm sido a reação em cadeia da polimerase ('polymerase chain reaction' - PCR) e a hibridização de ácidos nucleicos. Esta última técnica utiliza uma sonda de DNA, que é uma secção de DNA de fita simples que possui uma sequência homóloga a uma porção específica do genoma de um vírus. Em condições apropriadas, a sonda pode hibridizar com a sequência homóloga do ácido nucleico alvo e a presença do híbrido pode ser detectada através da incorporação de um marcador molecular na sonda.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) baseia-se na amplificação enzimática de um fragmento do ácido nucleico, específico para o patógeno que se quer determinar, por um grande número de vezes. A detecção é feita eletroforéticamente ou por outros meios. Teoricamente, quantidades muito pequenas do patógeno são suficientes para o início da reação, conferindo ao teste uma sensibilidade muito grande.

2.7 Marcadores moleculares

Por identificarem indiretamente o genótipo desejado, marcadores moleculares ligados a alelos de importância agronômica cujos fenótipos sejam de difícil avaliação, permitem acelerar o processo de seleção (MORGANTE; HANAFEY; POWELL, 2002). Isto porque, além de possibilitarem a redução das operações relacionadas a fenotipagem e manutenção de isolados em hospedeiros vivos no caso de parasitas obrigatórios como os vírus, esses não são influenciados por condições ambientais, como pode ocorrer com a fenotipagem feita de maneira convencional.

De fato a seleção assistida por marcadores (SAM) tornou-se uma ferramenta bastante utilizada na seleção indireta de genótipos desejados no tomateiro, especialmente para seleção de alelos de resistência a doenças. Até agora mais de 40 alelos que conferem resistência a algumas das principais doenças do tomateiro estão associados a marcadores moleculares e estão disponíveis na literatura (BARONE, 2009).

Independentemente do tipo de marcador utilizado na seleção, marcadores proximamente associados ao(s) alelo(s) de resistência de interesse podem ajudar a acelerar o programa de melhoramento, por permitir acompanhar ao longo das gerações de seleção esse alelo, sem que seja necessária na maioria das vezes, a avaliação fenotípica convencional em cada geração.

Entre os marcadores mais utilizados e conhecidos, estão os SSR (Single Sequence Repeats) ou Microssatélites, que são baseados em PCR com primers de regiões conhecidas. Os microssatélites consistem em repetições de sequências geralmente de dois a seis nucleotídeos, ocupando uma extensão de até 100 pares de bases. Essas sequências são distribuídas em todo o genoma e são flanqueadas por sequências altamente conservadas. O polimorfismo é criado de acordo com o

número de vezes em que essas bases se repetem no genoma e o resultado pode ser visualizado em gel de poliacrilamida ou géis de agarose mais concentrados. É um tipo de marcador codominante, e tem as vantagens de ser rápido e permitir que se faça a análise de um grande número de primers por amostra em géis multiplex (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Muitos autores citam como a maior limitação do uso de marcadores microssatélites a montagem ou desenvolvimento dos primers, pois para isso depende que se conheçam sequências flanqueando bases repetidas (BRONDANI et al., 2003; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Suplantada essa dificuldade, marcadores microssatélites passam a ser um dos mais promissores tipos de marcadores moleculares, tanto que são dos mais utilizados (NUNOME et al., 2003).

Existem hoje disponíveis mais de 600 primers para marcadores microssatélite disponibilizados, que foram desenvolvidos com base em informações do genoma do tomate pela Universidade de Cornell, que podem ser utilizados para as mais diversas finalidades em estudos genéticos do tomateiro e espécies relacionadas, podendo inclusive serem utilizados como possíveis marcadores de alelos de resistência à doenças.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As geminiviroses causadas por espécies do gênero *Begomovirus* estão entre as doenças de maior importância econômica para o tomateiro, devido à sua alta incidência e severidade em áreas tropicais e subtropicais do mundo, representando um dos problemas mais difíceis de serem afrontados pelos produtores. O controle das geminiviroses está associado a um conjunto de medidas preventivas, que na maioria das vezes não são eficientes. Um dos métodos mais promissores para o controle da doença é o uso de cultivares resistentes. Trabalhos desenvolvidos para selecionar fontes de resistência a geminivírus têm utilizado o alelo *Ty-I*, que tem sido a fonte de resistência genética mais comumente empregada. As poucas cultivares de tomate hoje disponíveis no mercado foram obtidas por meio do melhoramento convencional. Para isso, são realizados vários cruzamentos e posterior fenotipagem dos indivíduos quanto à resistência, sendo por isso um trabalho laborioso e na maioria das vezes de pouca eficiência, devido às possibilidades de escapes. Assim, a identificação de marcadores moleculares associados a alelos de resistência à geminivírus pode contribuir para estabelecer melhores estratégias de melhoramento e seleção de genótipos resistentes.

REFERÊNCIAS

ACCOTTO, G. P. et al. Typing of tomato yellow leaf curl viruses en Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 106, p.179-186, 2000.

AMBROZEVICIUS, L. P. **Caracterização parcial de uma nova espécie de Begomovirus e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro no sudeste do Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 2000.

BARONE, A. **Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato**. Disponível em: < <http://www.fao.org/biotech/docs/Barone.pdf> >. Acesso em: jul. 2009.

BEZERRA, I. C. et al. Survery of geminivirus infection in tomato producing áreas in Federal District. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 8., 1996, São Lourenço. **Resumos...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 1996. p. 289.

BRONDANI, C. et al. Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. **Hereditas**, Lund, v. 138, p.187-192, 2003.

BROWN, J. K.; FROHLICH, D. R.; ROSELL, R. C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 511-534, 1995.

CALEGARIO, R. F. et al. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1335-1343, set. 2007.

COLARICCIO, A. **O impacto das viroses na cultura do tomateiro**. Disponível em: < <http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/impacviro.pdf> >. Acesso em: 24 maio 2009.

COLARICCIO, A. et al. Presence of *Tomato rugose mosaic virus* TRMV) in tomato crops of crops of São Paulo, Brasil. **Virus Reviews & Research**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 191, 2003.

COSTA, A. S.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, D. M. Transmissão mecânica do agente causal do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 3, n. 3, p. 195-200, 1977.

EL MEHRACH, K. et al. **PCR-Based methods for tagging the *Mi-1* locos for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germoplasm**. Disponível em: <<http://www.plantpath.wisc.edu/InVirLab/does/Mi-Two-step-PCR.htm>>. Acesso em: 22 maio 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA EM AGROPECUÁRIA. **Sistemas e produção**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FONTEHTML/Tomate/TomateIndustrial/doencas_virus.htm>. Acesso em: 24 maio 2009.

FAOSTAT database results. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 19 abr. 2010.

FAUQUET, C.M. et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, Wien, v. 153, p. 783-821, 2008.

FERNANDES, F. R. et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, New York, v. 36, p. 251-258, 2008.

FERNANDES, J. J. et al. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, Reading, v. 55, p. 513-522, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENERGEN, 1998. 220 p.

GERLING, D. **Whiteflies**: their bionomics, pest status and management. Hants: Intercept, 1990. p. 147-185.

GIORDANO, L. B. et al. Desenvolvimento de linhagens e cultivares de tomateiro para o nordeste do Brasil com resistência a Tospovirus e Geminivirus. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDBERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2005. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br>>. Acesso em: 23 abr. 2010.

GÓMEZ, O. et al. Breeding for resistance to begomovirus in tropic-adapted tomato genotypes. **Plant Breeding**, Berlin, v. 123, p. 275-279, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 25 abr. 2009.

LATERROT, H. Breeding network to create tomato varieties resistant to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). **Fruits**, Les Ulis, v. 50, p. 439-444, 1995.

LIMA, M. F. et al. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do submédio do vale do São Francisco.

Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 26, n. 1, p. 81-85, 2001.

LOURENÇÃO, A. L. et al. Avaliação da resistência de acessos de tomateiro a tospovírus e a geminivírus. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 193-196, 2004.

MARUTHI, M. N. et al. Comparison of resistance to *Tomato leaf curl virus* (India) and *tomato yellow crul leaf virus* (Israel) among *Lycopersicon* wild species, breeding lines and hybrids. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 109, p. 1-11, 2003.

MATOS, E. S. et al. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, mar./abr, 2003.

MELO, P. C. T.; RIBEIRO, A. Produção de sementes de tomate: cultivares de polinização livre e híbridos. In: CASTELANNE, P. D.; NICOLSI, W. M.; HASEGAWA, M. (Ed.) **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal: FCAV/FUNEP, 1990. p. 261.

MENEZES, C.B. et al. Seleção assistida por marcadores em tomate para resistência a tospovírus (TSWV). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 1-324, ago. 2004. Suplemento.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v. 30, p. 94-200, 2002.

NUNOME, T. et al. Identification and characterization of microsatellites in eggplant. **Plant Breeding**, Berlin, v. 122, p. 256-262, 2003.

OLIVEIRA, M. R. V. Mosca Branca, *Bemisia tabaci* raça B (Hemiptera: Aleyrodidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Ed.) **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. v. 9, p. 61-71.

OLIVEIRA, M. R. V.; HENNEBERRY, T. J.; ANDERSON, P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, Boston, v. 20, p. 709-723, 2001.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. New species of wild tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. **Systematic Botany**, Washington, v. 30, p. 424-434, 2005.

PILARTZ, M.; JESKE, H. Mapping of abutilon mosaic geminivírus minichromossomes. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, p. 10808-10818, 2003.

RIBEIRO, S. G. et al. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, Orlando, v. 97, p. 702-711, 2007.

RITSCHER, P. S. et al. Towards the development of a microsatellite marker based genetic map of melon. In: THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE STATUS OF PLANT, ANIMAL & MICROBEE GENOMES RESEARCH, 10, 2002, San Diego. **Anais...** San Diego, 2002. p.129.

SANTANA, F. M. et al. Sources OF RESISTANCE IN *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 122, p. 45-51, 2001.

SANTOS, C. D. G. et al. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 450-455, 2004.

SAWANGJIT, S. et al. Molecular characterization of tomato-infecting begomovirus in Thailand. **Virus Research**, Atlanta, v. 109, p. 1-8, 2005.

SOLGEN. **Solanaceae genomics network**. Disponível em: <http://www.http://sgn.cornell.edu/cgi-bin/search/markers/ssr_list.pl>. Acesso em: 20 jun. 2010.

STANLEY, J. et al. **Virus taxonomy**: eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier, 2005. p. 301-326.

SUINAGA, F. A.; CASALI, V. W. D.; SILVA, D. J. H.; PICANÇO, M.C. Dissimilaridade genética de fontes de resistência de *Lycopersicon* spp. a *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, p. 371-376, 2003.

ZAMIR, D. et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-l*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, n. 2, p.141-146, May 1994.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**MARCADOR MICROSSATÉLITE ASSOCIADO AO ALELO *Ty-1* QUE
CONFERE RESISTÊNCIA A BEGOMOVÍRUS EM TOMATE**

**Artigo redigido conforme norma da revista Pesquisa Agropecuária
Brasileira – PAB**

Marcador microssatélite associado ao alelo *Ty-1* que confere resistência a begomovírus em tomate.

Danilo Gustavo Nogueira⁽¹⁾, Wilson Roberto Maluf⁽²⁾, Douglas Willian Nogueira⁽¹⁾, Gabriel Mascarenhas Maciel⁽²⁾, Luciano Vilela Paiva⁽³⁾ e Antônio dos Reis Figueira⁽⁴⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Biologia, Caixa Postal 3.037, CEP 37.200-000. Lavras, MG. E-mail: asp.nogueira@yahoo.com.br, douglagen@yahoo.com.br ⁽²⁾UFLA, Departamento de Agricultura. E-mail: wrmaluf@dag.ufla.br, gabrielmascarenhasmaciel@yahoo.com.br ⁽³⁾(UFLA), Departamento de Química. E-mail: luciano@ufla.br ⁽⁴⁾(UFLA), Departamento de Fitopatologia. E-mail: antonia@ufla.br

Resumo - O objetivo do trabalho foi associar marcador microssatélite ao alelo *Ty-1* que confere resistência a begomovírus em tomate, e comprovar sua eficiência na seleção de linhagens resistentes ao vírus. Os marcadores SSR-47 e SSR-48 foram testados em linhagens isogênicas contrastantes para a presença do alelo *Ty-1* (LA-3473, LA-3474, LA-3475). O marcador SSR-47 por apresentar polimorfismo, foi o único utilizado nas demais etapas do trabalho. Detectada preliminarmente a associação entre o marcador SSR-47 e o alelo *Ty-1*, testou-se sua eficiência na seleção de genótipos avançados de tomateiro. Para confirmar a eficiência da seleção foi realizada avaliação fenotípica das plantas com padrões contrastantes de bandas para SSR-47 quanto à resistência a begomovírus. Todas as plantas com banda de 191 pb apenas foram resistentes ao begomovírus pelo teste de inoculação por enxertia, e todas com banda de 180 pb apenas foram suscetíveis; plantas com as 2 bandas também se apresentaram como resistentes. A distância máxima entre o gene de resistência a begomovírus *Ty-1* e o marcador SSR-47 foi de 2,7 cM, sendo este eficiente em caracterizar genótipos portadores do alelo *Ty-1*. A infecção do begomovírus, induzida via enxertia, manifestou, nos genótipos testados, sintomas condizentes com os resultados obtidos com o marcador molecular SSR-47.

Termos para indexação: *Lycopersicon esculentum*, *Solanum lycopersicum*, geminivírus, resistentes.

Microsatellite marker associated with the *Ty-1* allele for resistance to begomovirus in tomatoes.

Abstract - The objective of this work was to associate a microsatellite marker with the *Ty-1* allele that controls resistance to begomovirus in tomatoes, and to assess its efficiency in the selection of virus-resistant lines. Microsatellite markers SSR-47 and SSR-48 were tested in near isogenic tomato lines (LA-3473, LA-3474, LA-3475) with contrasting genotypes with reference to the *Ty-1* allele. SSR-47 was polymorphic and was subsequently used in the next phases of research. An association between the SSR-47 marker and the *Ty-1* locus was detected, and its efficiency for selection of begomovirus resistant genotypes in tomato was assessed. Plants with contrasting banding patterns for the SSR-47 marker were tested for their reaction to begomovirus. All plants with a single 191 bp band were resistant to begomovirus, as inoculated via grafting. Plants with a single 180 bp band were susceptible, and plants with both 191bp and 180 bp bands were resistant. The maximum distance between *Ty-1* and the SSR-47 marker was 2,7 cM, and the marker was therefore efficient to identify genotypes bearing the *Ty-1* allele. Plant responses to graft inoculation of begomovirus were consistent with reactions predicted with the use of the SSR-47 marker.

Index terms: *Lycopersicon esculentum*, *Solanum lycopersicum*, geminivirus, resistant

Introdução

As doenças conhecidas como geminiviroses causam perdas significativas na cultura do tomateiro, nas principais regiões do mundo onde essa solanácea é cultivada (Faria et al., 2000; Moriones & Navas Castillo, 2000). Entre os geminivírus (família Geminiviridae), o gênero *Begomovirus*, que infecta o tomate (*Solanum lycopersicum*, sin. *Lycopersicon esculentum*) é transmitido pelas moscas-brancas do gênero *Bemisia*. Os begomovírus podem apresentar genoma bipartido ou monopartido. No Brasil, diversos surtos de geminiviroses foram observados em tomateiro, principalmente, após a introdução do biótipo B do vetor *Bemisia tabaci* (= *Bemisia argentifolii*) e, hoje, além de cinco espécies reconhecidas, outras doze espécies “provisórias” de begomovírus foram identificadas infectando essa cultura (Castillo-Urquiza et al., 2008; Fauquet et al., 2008). Os principais sintomas causados são enrolamento da folha, epinastia, mosaico-dourado, rugoses, cloroses nervais, cloroses internervais, mosqueado e atrofia que resultam em redução da floração, paralisação no crescimento e conseqüente perda na produção, principalmente se a infecção das plantas ocorrer nos estádios iniciais de desenvolvimento (Zhou et al., 2008).

Em campo, a disseminação do vírus é em geral controlada por meio do controle químico da mosca-branca, entretanto esse procedimento não é totalmente eficaz, em função do aparecimento de populações resistentes a inseticidas (Gerling, 1990) e pelo fato da doença ser diagnosticada em estádios avançados, na maioria das vezes (Embrapa, 2009). Um dos métodos mais promissores para o controle da doença é o uso de cultivares resistentes (Matos et al., 2003). Poucas fontes de resistência a geminivírus vem sendo utilizadas no desenvolvimento de cultivares comerciais e, dessas a mais comum é a conferida pelo alelo *Ty-1*, proveniente da espécie selvagem *S. chilense* (Maruthi et al.,

2003; Santana et al., 2001). Na Europa, acessos tolerantes a begomovírus com genoma monopartido foram também tolerantes a alguns isolados com genoma bipartido (Matos et al., 2003; Santana et al., 2001), em função da introgressão do alelo *Ty-1*. Estudos recentes, realizados no Brasil, mostraram que o loco *Ty-1* confere reação de tolerância a distintas espécies de *Begomovirus* bipartidos (Boiteux et al., 2007).

As poucas cultivares resistentes hoje disponíveis no mercado foram obtidas através do melhoramento genético convencional. Para isso, são em geral realizados vários cruzamentos e posterior fenotipagem dos indivíduos obtidos por meio de inoculações. Diante dessas dificuldades em fenotipar e selecionar os indivíduos desejados, principalmente para resistência às doenças de natureza virótica (El Mehrach et al., 2009; Menezes, 2004), a identificação de marcadores moleculares ligados a alelos de resistência é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento em andamento no mundo para a cultura do tomateiro (Barone, 2009). A identificação de alelos de resistência a geminivírus associados a marcadores moleculares pode contribuir para estabelecer melhores estratégias de melhoramento e seleção de genótipos resistentes.

Vários são os tipos de marcadores moleculares associados a genes de resistência a doenças, entre eles destacam-se os microssatélites que possuem herança codominante (Ritschel et al., 2002). Mais de 40 alelos que conferem resistência a algumas das principais doenças do tomateiro estão associados a marcadores moleculares e estão disponíveis na literatura (Barone, 2009). Mais de 600 primers de microssatélite já foram descritos para o tomateiro (embora não mapeados, em sua maioria), apresentando por isso um grande potencial de serem utilizados como candidatos a marcadores associados a genes que contêm alelos de resistência a doenças. Informações sobre esses marcadores estão disponíveis na internet na página do Sol Genomics Network (2010).

O alelo *Ty-1* que confere resistência a begomovírus foi mapeado por Zamir et al., (1994) no cromossomo 6 próximo à região do centrômero, intimamente ligado (< 1 cM) ao alelo *Mi* que confere resistência a nematóides de galhas (*Meloidogyne* spp.), porém em fase de repulsão. Portanto, linhagens cuja resistência a begomovírus é conferida pelo alelo *Ty-1* são presumivelmente suscetíveis a nematóides (Mi^+).

O comprimento total do genoma do tomate foi estimado em aproximadamente 1275 cM (Livingstone et al., 1999) e, mais recentemente em 1356 cM (Zhang et al., 2002). Admitindo-se mais de 600 pares de primers de microssatélite aleatoriamente distribuídos ao longo do genoma do tomateiro (Sol Genomics Network, 2010), ter-se-ia uma distância média entre esses marcadores estimada em aproximadamente 2,1 cM. Com base nesses números, existe uma grande possibilidade de se encontrar marcadores microssatélites no cromossomo 6, associados ao alelo *Ty-1*, principalmente porque trabalhos têm demonstrado que boa parte dos marcadores microssatélites estão associados a região centromérica do genoma do tomateiro, na qual *Ty-1* está localizado (Areshchenkova & Ganai, 2002).

Este trabalho foi realizado com os objetivos de associar marcador de microssatélite ao alelo *Ty-1* que confere resistência a begomovírus em tomate, e comprovar sua eficiência na seleção de linhagens resistentes ao vírus.

Material e Métodos

Escolha preliminar de possíveis marcadores associados ao gene *Ty-1*

Entre os mais de 600 pares de primers SSR desenvolvidos pela Universidade de Cornell (EUA) e disponíveis no Sol Genomics Network (2010), foram selecionados dois pares (SSR-47; SSR-48) por estarem mapeados no cromossomo 6 próximo ao alelo *Mi*, que, segundo Zamir et al., (1994) dista a < 1 cM do loco *Ty-1*. Dos dois pares de primers escolhidos, o(s) que apresentou (apresentaram) polimorfismo foi utilizado (s) como possível marcador para *Ty-1*. Para a verificação da existência de polimorfismo, os primers SSR-47 e SSR-48 foram primeiramente testados em linhagens isogênicas contrastantes para a presença do alelo *Ty-1*. Foram utilizadas as seguintes linhagens originárias do Charles M. Rick Tomato Genetics Stock Center/University of Califórnia - Davis: LA-3475 = constituição genotípica: *Ty-1*⁺/*Ty-1*⁺, suscetível a geminivírus; LA-3473 = constituição genotípica: *Ty-1*/*Ty-1*, resistente a geminivírus (isogênica a LA-3475); LA-3474 = constituição genotípica: *Ty-1*⁺/*Ty-1*⁺, suscetível a geminivírus (isogênica a LA-3475).

Os procedimentos utilizados para verificação da existência ou não de polimorfismo entre os genótipos suscetíveis (*Ty-1*⁺/*Ty-1*⁺) e resistentes (*Ty-1*/*Ty-1*) a begomovírus estão indicados no item “Extração de DNA, reação de PCR, e eletroforese em gel de poliacrilamida”. Os primers utilizados foram os obtidos por Sol Genomics Network (2010), a saber: (a) para SSR-47= *forward primer* TCC TCA AGA AAT GAA GCT CTG A; *reverse primer* CCT TGG AGA TAA CAA CCA CAA; (b) para SSR-48= *forward primer* ATC TCC TTG GCC TCC TGT TT; *reverse primer* GTC ATG GCC ACA TGA ATA CG. O possível marcador SSR-48 não apresentou polimorfismo, ao contrário do SSR-47, que por esta razão foi o único utilizado nas próximas etapas do trabalho.

Obtenção de novas linhagens com resistência a begomovírus

Novas linhagens de tomateiro foram obtidas a partir do cruzamento inicial da linhagem LA-3473 (suscetível a nematóide, resistente a geminivírus = $Mi^+Ty-I/-Mi^+Ty-I$) com três diferentes linhagens de tomateiros homozigotas para resistência a nematóides e suscetíveis a geminivírus ($Mi\ Ty-I^+/Mi\ Ty-I^+$). As linhagens resistentes a nematóides foram utilizadas como parentais recorrentes em 3 retrocruzamentos sucessivos, em cujas gerações segregantes foram sempre selecionadas plantas suscetíveis a nematóides (Mi^+/Mi^+), presumivelmente resistentes a begomovírus (embora sua resistência a begomovírus não tivesse sido testada). Na geração F_4 do terceiro retrocruzamento, foi feita a seleção final, também para suscetibilidade a nematóide (Mi^+/Mi^+), obtendo-se plantas cujas populações foram designadas pelos códigos BPX-373F, BPX-374F, BPX-375E, respectivamente. A seleção para suscetibilidade a nematóide (Mi^+/Mi^+) foi feita após inoculações com ovos de *Meloidogyne* spp. segundo os procedimentos descritos por Carvalho et al., (1999). A linhagem LA-3473, resistente a begomovírus ($Mi^+Ty-I/-Mi^+Ty-I$), foi utilizada em combinação com uma linhagem resistente a nematóide, sabidamente suscetível a geminivírus ($Mi\ Ty-I^+/Mi\ Ty-I^+$), na obtenção do híbrido TEX-143, presumivelmente de genótipo ($Ty-I/Ty-I^+$), ou seja, resistente heterozigoto para $Ty-I$. Estas plantas foram testadas com o marcador SSR-47 associado para o alelo $Ty-I$.

Resistência a begomovírus e possível associação com o marcador SSR-47

Famílias F_5RC_3 resultantes da autofecundação de plantas BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E foram designadas respectivamente BPX-373G, BPX-374G e BPX-375F, e testadas (20 plantas por família) quanto à: (a) perfil de bandas gerado pelo marcador molecular SSR-47 preliminarmente associado para o alelo $Ty-I$; (b) Resistência a begomovírus (seleção direta, inoculação com vírus pelo processo de

enxertia), conforme indicado no item “Inoculação com begomovírus e avaliação fenotípica das plantas quanto a resistência”.

Extração de DNA, reação de PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida

Foram coletados folíolos de cada planta e colocados em envelopes plásticos devidamente identificados e acondicionados em caixa de isopor contendo gelo, sendo imediatamente levados para o Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras-Lavras-MG, onde procedeu-se à extração do DNA.

O DNA foi extraído em microtubos de 1,5 ml, a partir de 120 miligramas de tecido foliar, conforme sugerido por Ferreira & Grattapaglia (1998).

Para a reação de PCR, foi obtido um mix por amostra contendo: 2,5 µL de tampão PCR 10X; 0,75 µL MgCl₂ 50 mM; 0,50 µL de dNTP 10 mM; 1,25 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 10 mM; 0,25 µL Taq polimerase 1 unidade; 1,0 µL de DNA 20-50 ng; 17,5 µL de H₂O ultrapura autoclavada. A amplificação foi inicialmente conduzida por 5 min/94°C, seguido por 35 ciclos de 30 s/94°C; 45 s/45°C e 2 min/72°C. A reação final de elongação foi de 5 min/72°C.

Para a realização da eletroforese foram utilizados 11,5 µL do produto da PCR de cada amostra e pipetados em 4,0 µL de corante azul de bromofenol 1 X. A fixação dos fragmentos foi feita em gel de poliacrilamida 15% e tampão TBE 1X. A coloração foi feita com brometo de etídio e as bandas no gel foram visualizadas em luz ultravioleta a 260 nm e fotografadas.

Inoculação com begomovírus e avaliação fenotípica das plantas à resistência

Sementes BPX-373G, BPX-374G e BPX-375F foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células utilizando o substrato comercial Plantmax®, juntamente com as testemunhas LA-3473 (homozigota resistente a begomovírus), LA-3474 (homozigota suscetível), LA-3475 (homozigota suscetível) e TEX-143 (híbrido presumivelmente resistente heterozigoto - *Ty-1/Ty-1⁺*). Decorridos 28 dias após a semeadura, 20 plantas de cada família foram transplantadas para vasos de 1,5 litros sendo inoculadas com o vírus pelo processo de enxertia. Para tanto, plantas de tomate da cv. Santa Clara (suscetível a begomovírus), foram utilizadas para retirada de estacas com sintomas severos, coletadas na parte apical de plantas sabidamente contaminadas com uma estirpe de begomovírus (identificada como tal no laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras). Tais estacas de tomateiro cv. Santa Clara infectadas com geminivírus foram enxertadas em plantas assintomáticas a serem testadas. Esta inoculação por enxertia foi realizada após as plantas a serem testadas atingirem o estágio fenológico ideal, de quatro a cinco folhas verdadeiras ou 10 dias após o transplantio. Decorridos 40 dias após enxertia, as 20 plantas testadas de cada famílias foram avaliadas como suscetíveis (S = presença de sintomas) ou resistentes (R= ausência de sintomas). A temperatura da casa de vegetação variou de 27°C a 35°C e a umidade relativa do ar variou de 60% a 100% no período em que foi realizado o experimento.

Distância genética entre o marcador SSR-47 e o alelo *Ty-1*

A distância genética entre o marcador SSR-47 e o alelo *Ty-1* será estimada com base na frequência de plantas recombinantes encontradas durante os retrocruzamentos que levaram à obtenção das populações BPX-373F, BPX-

374F, e BPX-375E. Na hipótese de não serem encontradas plantas recombinantes (plantas suscetíveis a nematóides - Mi^+/Mi^+ que apresentem a banda SSR-47 correspondente à existente nas testemunhas $Ty-I^+/Ty-I^+$ LA-3474 e LA-3475), será estimada a distância máxima esperada entre estes alelos ao nível de 95% de probabilidade, através da expressão: $(1 - c)^n \geq 0.95$, onde n= número de retrocruzamentos efetuados =3.

Resultados e Discussão

Bandas polimórficas foram observadas para o marcador molecular SSR-47 mostrando sua eficiência em distinguir entre linhagens LA-3473, com plantas homozigotas resistentes (*Ty-I/Ty-I*), das plantas homozigotas suscetíveis (*Ty-I⁺/Ty-I⁺*) de LA-3474 e LA-3475 (Figura 1). Plantas da linhagem LA-3473 mostraram uma banda única, de 191 pb, que caracteriza portanto genótipos homozigotos resistentes (*Ty-I/Ty-I*). Plantas das linhagens LA-3474 e LA-3475 mostraram uma banda única de 180 pb, que caracteriza pois os genótipos homozigotos suscetíveis (*Ty-I⁺/Ty-I⁺*). O marcador SSR-48 não apresentou polimorfismo entre os genótipos resistentes e suscetíveis (Figura 1),

Uma vez detectada preliminarmente a associação entre o marcador SSR-47 e o alelo *Ty-I*, testou-se sua eficiência na seleção de genótipos avançados (Tabela 1). Os padrões de bandas do marcador SSR-47 apresentados por plantas das populações BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E foram comparados com os apresentados pelas testemunhas LA-3473 (*Ty-I/Ty-I*, homozigoto resistente), LA-3474 (*Ty-I⁺/Ty-I⁺*, homozigoto suscetível), LA-3475 (*Ty-I⁺/Ty-I⁺*, homozigoto suscetível) e TEX-143 (*Ty-I⁺/Ty-I*, heterozigoto resistente). Estas testemunhas apresentaram, respectivamente, uma banda superior de 191 pb em LA-3473, uma banda inferior de 180 pb em LA-3474 e LA-3475, e as duas bandas (180 pb/191 pb) em TEX-143, confirmando que o marcador SSR-47 é do tipo codominante – uma das vantagens do marcador tipo microssatélite.

Todas as plantas das populações BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E, quando testadas com o marcador SSR-47, apresentaram padrões de banda única de 191pb, que caracteriza genótipos homozigotos resistentes (*Ty-I/Ty-I*) o mesmo apresentado pela testemunha homozigota resistente LA-3473. Uma vez que durante o processo de sua obtenção foi utilizado apenas o critério de serem

suscetíveis a nematóides (Mi^+/Mi^+), fica evidente uma ligação gênica entre a reação a nematóides e o marcador SSR-47 utilizado.

Uma vez que os locos Mi , $Ty-1$ e SSR-47 estão localizados muito próximos entre si (Solgen, 2010; Zamir et al., 1994), era de se esperar uma alta frequência de associação entre genótipos de plantas suscetíveis a nematóides (Mi^+/Mi^+) e a presença de banda única, de 191 pb. Contudo, não foi detectada nenhuma planta recombinante, isto é, suscetível a nematóides (Mi^+/Mi^+) e possuidora de banda, de 180 pb. Esta ausência de recombinantes, mesmo após os três retrocruzamentos utilizados para a obtenção das populações BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E, permite estimar a distância genética entre Mi e o marcador SSR-47 em um valor máximo de $c = 1,7$ cM, em nível de 95% de probabilidade [valor obtido pela solução da expressão $(1 - c)^3 \geq 0,95$].

A distância de 1,7 cM obtida pela solução da expressão esta próxima da encontrada no mapa do tomateiro (1,0 cM), no qual o alelo Mi esta mapeado a 5,5 cM e o marcador SSR-47 a 6,5 cM da extremidade do cromossomo 6 (Sol Genomics Network, 2010). Uma vez que a distância entre o Mi e $Ty-1$ é provavelmente inferior a 1 cM (Zamir et al., 1994), pode-se estimar a distância máxima esperada entre $Ty-1$ e o marcador SSR-47 como sendo de $(1 + 1,7) = 2,7$ cM, considerando a distância entre Mi e o marcador SSR-47 de 1,7 cM. Considerando-se a distância de 1 cM obtida pelo mapa do Sol Genomics Network, ter-se-ia $(1 + 1) = 2,0$ cM de distância, resultados obtidos na hipótese de a sequência linear dos locos ser $Ty-1 \rightarrow Mi \rightarrow SSR-47$. Na hipótese de a sequência linear dos locos ser $Mi \rightarrow Ty-1 \rightarrow SSR-47$, a distância estimada entre $Ty-1$ e o marcador SSR-47 seria de aproximadamente $(1,7 - 1) = 0,7$ cM, considerando a distância calculada, e de $(1 - 1) = 0,0$ cM, considerando a distância obtida pelo mapa. No presente ensaio, não é possível distinguir

qual das hipóteses de sequência linear dos locos é a verdadeira, mas, de qualquer modo, a distância máxima de apenas 2,7 cM, determinada para a pior das duas hipóteses, é bastante próxima da estimada pelo mapa do Sol Genomics Network, e já indica a utilidade do marcador SSR-47 para a seleção de plantas resistentes a begomovírus.

Plantas (F_4RC_3) das populações BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E, previamente identificadas portadoras da banda de 191 pb normalmente associada ao genótipo *Ty-1/Ty-1*, tiveram suas respectivas famílias F_5RC_3 BPX-373G, BPX-374G e BPX-375F (vinte plantas por família) testadas fenotipicamente para a resistência ao vírus pelo processo de inoculação por enxertia, e genotipicamente através do marcador SSR-47.

As famílias obtidas, BPX-373G-06-02-01, BPX-373G-06-10-01, BPX-373G-07-03-03, BPX-374G-01-01-03, BPX-374G-01-02-03, BPX-374G-04-08-02, BPX-374G-04-12-01, BPX-375F-04-01-02, BPX-375F-04-08-04, bem como a testemunha resistente LA-3473 (Tabela 2) demonstraram reação de resistência ao vírus uma vez que as brotações novas não apresentaram nenhum sintoma característico do vírus caracterizando, portanto famílias resistentes a begomovírus. Análise feita com o marcador SSR-47 em todas as plantas de cada família revelou apenas a presença da banda de 191 pb que caracteriza famílias homozigotas resistentes (*Ty-1/Ty-1*) (Tabela 2 e Figura 2).

Todas as plantas do híbrido TEX-143 apresentaram sintomas atenuados da doença logo após o processo de inoculação, que foram diminuindo devido ao surgimento de brotações novas mais distantes do ponto de enxertia, sendo por isso classificado como resistente a begomovírus. Esta ocorrência se explica pelo fato do alelo *Ty-1* interferir na proteína viral responsável pela circulação do vírus na planta (Zamir et al., 1994), dificultando a disseminação sistêmica das partículas virais do enxerto para as brotações mais novas da planta. Boiteux et al., (2007) verificaram que genótipos heterozigotos (*Ty-1/Ty-1⁺*) e homozigotos

suscetíveis ($Ty-I^+/Ty-I^+$) apresentaram 35% e 95% respectivamente de plantas exibindo sintomas de infecção de begomovírus após serem submetidos a condições de inóculo natural sob elevada densidade populacional de moscas-brancas virulíferas - resultados indicativos que o alelo $Ty-I$ é efetivo mesmo em heterozigose. No entanto, os autores não avaliaram genótipos homozigotos resistentes ($Ty-I/Ty-I$).

Os resultados obtidos (Tabela 2 e Figura 2) indicam que as reações fenotípicas de resistência/suscetibilidade à begomovírus mostram perfeita concordância com os resultados obtidos com o genótipo indicado pelo marcador SSR-47. Este fato, e a distância bastante próxima estimada entre os locos $Ty-I$ e SSR-47, permitem concluir que a seleção de plantas resistentes a begomovírus com base no marcador SSR-47 pode substituir com boa margem de segurança a seleção de plantas resistentes com base na avaliação fenotípica.

Conclusões

1. O marcador SSR-47 está associado ao alelo *Ty-I*, a uma distância estimada de no máximo 2,7 cM.
2. Os resultados das avaliações de resistência a begomovírus, obtidos por meio do teste de enxertia, apresentam perfeita concordância com os resultados obtidos com o marcador molecular SSR-47, o que confirma a utilidade desse marcador para caracterização de genótipos de tomateiro quanto à presença do alelo *Ty-I* de resistência a begomovírus.
3. As famílias BPX-373G-06-02-01, BPX-373G-06-10-01, BPX-373G-07-03-03, BPX-374G-01-01-03, BPX-374G-01-02-03, BPX-374G-04-08-02, BPX-374G-04-12-01, BPX-375F-04-01-02, BPX-375F-04-08-04, a testemunha LA-3473 e o híbrido TEX-143 apresentaram resistência a begomovírus.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à Universidade Federal de Lavras (UFLA); à FAEPE/UFLA, à FUNDECC/UFLA, à empresa HortiAgro Sementes Ltda, ao Laboratório Central de Biologia Molecular/UFLA e ao Laboratório de Virologia Molecular/UFLA.

Versão preliminar do artigo, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

Referências

- ARESHCHENKOVA, T.; GANAL, M.W. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. **Theor Appl Genet**, v.104, p.229-235, 2002.
- BARONE, A. **Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato**. Disponível em: < <http://www.fao.org/biotech/docs/Barone.pdf> >. Acesso em: jul. 2009.
- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA, V.R.; SILVA, C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO, L.B. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite Begomovirus species. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.25, p.20-23, jan./mar. 2007.
- CARVALHO, J.W.A.; MALUF, W.R.; FIGUEIRA, A.R.; GOMES, L.A.A. Obtenção de linhagens de tomateiro de crescimento determinado com resistência múltipla a nematóides de galhas e a tospovírus. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v.23, n.3, p.593-607, jul./set., 1999.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology** v.153, p.1985-1989, 2008.
- EL MEHRACH, K.; MEJIA, L.; WILLIAMSON, V.M.; HATIMI, A.; TAHROUCH, S. **PCR-Based methods for tagging the *Mi-1* locos for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germoplasm**. Disponível em: <<http://www.plantpath.wisc.edu/InVirLab/does/Mi-Two-step-PCR.htm>>. Acesso em: 22 maio 2009.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA EM AGROPECUÁRIA. **Sistemas e produção**. Disponível em: < http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FONTESHTML/Tomate/TomateIndustrial/doencas_virus.htm >. Acesso em: 24 maio 2009.
- FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.125-137, 2000.

FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M.; ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**. V.153, p.783-821, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220p.

GERLING, D. Whiteflies: their bionomics, pest status and management. **Intercept**, England, p. 147-185, 1990

LIVINGSTONE, H.D.; LACKNEY, U.K.; BLAUTH, J.R.; WIJK, R.V.; JAHN, M.K. Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. **Genetics**, v.152, p.1183-1202, 1999.

MARUTHI, M.N.; CZOSNECK, H.; VIAVSKI, F.; TARBA, S.Y.; MILO, J.; LEVIATOT, S.; VENKATESH, H.M.; PADMAJA, A.S.; KULKARNI, R.S.; MUNIYAPPA, V. Comparison of resistance to *Tomato leaf curl virus* (India) and *tomato yellow crul leaf virus* (Israel) among *Lycopersicon* wild species, breeding lines and hybrids. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.1-11, 2003.

MATOS, E.S.; SIQUEIRA, W.J.; LOURENÇÃO, A.L.; MELO A.M.T.; SAWAZAKI, H.E.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; COLARICCIO, A. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n. 2, p.159-165, mar./abr 2003.

MENEZES, C.B.; FIGUEIRA, A.R.; MALUF, W.R.; ZERBINI JÚNIOR, F.M.; NASCIMENTO, I.R.; NOGUEIRA, D.W.; STEVENS, M.R. Seleção assistida por marcadores em tomate para resistência a tospovirus (TSWV). **Fitopatologia Brasileira**, Vol. 29 (suplemento) S001-324. Gramado, agosto, 2004.

MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. **Virus Research**, v.71, n. 1-2, p.123-134, nov. 2000.

RITSCHER, P.S.; BUSO, G.S.C.; BUSO, J.A.; FERREIRA, M.E. **Towards the development of a microsatellite marker based genetic map of melon**. In: The International Conference on the Status of Plant, Animal & Microbee Genomes Research, 2002, San Diego. Plant, Animal & Microbe Genomes X. p.129

SANTANA, F.M.; RIBEIRO, S.G.; MOITA, A.W.; MORIERA Jr.; D.J.; GIORDANO, L.B. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted begomovirus from Brazil. **Euphytica**, v. 122, p.45-51, 2001.

SOLGEN. **Solanaceae genomics network**. Disponível em: <http://www.http://sgn.cornell.edu/cgi-bin/search/markers/ssr_list.pl>. Acesso em: 20 jun. 2010.

ZAMIR, D.; EKSTEIN-MICHELSON, I.; ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; SARFATTI, M.; ESHED, Y.; HAREL, E.; PLEBAN, T.; VAN-OSS, H.; KEDAR, N.; RABINOWITCH, H.D.; CZOSNEK, H. Mapping and introgression of tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.88, n.2, p.141-146. may, 1994.

ZHANG, L.P.; KHAN, A.; NINO-LIU, D.; FOOLAD, M.R. A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* cross. **Genome**. v.45, p.133-146, 2002.

ZHOU, Y.C.; NOUSSOUROU, M.; KON, T.; ROJAS, M.R.; JIANG, H.; CHEN, L.F.; GAMBY, K.; FOSTER, R.; GILBERTSON, R.L. Evidence of local evolution of tomato-infecting begomovirus species in West Africa: characterization of tomato leaf curl Mali virus and tomato yellow leaf crumple virus from Mali. **Archives of Virology**, v.153, p.693-703, 2008.

Tabela 1 Resultado do padrão eletroforético utilizando o marcador molecular SSR-47 em famílias avançadas de tomateiro. Lavras, UFLA, 2009

Genótipos	Padrão de Bandas Observadas ¹		
	180 pb	180/191 pb	191pb
LA-3473 (Testemunha homozigota resistente)	-	-	+
LA-3474 (Testemunha homozigota suscetível)	+	-	-
LA-3475 (Testemunha homozigota suscetível)	+	-	-
TEX-143 (Heterozigoto resistente)	-	+	-
BPX-373F-06-02 -01	-	-	+
BPX-373F-06-03-02	-	-	+
BPX-373F-06-04-03	-	-	+
BPX-373F-06-06-01	-	-	+
BPX-373F-06-10-01	-	-	+
BPX-373F-06-10-02	-	-	+
BPX-373F-06-14-01	-	-	+
BPX-373F-06-16-01	-	-	+
BPX-373F-07-03-03	-	-	+
BPX-373F-07-04-01	-	-	+
BPX-373F-07-05-03	-	-	+
BPX-373F-07-09-03	-	-	+
BPX-374F-01-01-03	-	-	+
BPX-374F-01-02-03	-	-	+
BPX-374F-04-08-02	-	-	+
BPX-374F-04-12-01	-	-	+
BPX-374F-04-12-03	-	-	+
BPX-374F-05-07-01	-	-	+
BPX-374F-05-07-03	-	-	+
BPX-374F-06-02-02	-	-	+
BPX-375E-04-01-01	-	-	+
BPX-375E-04-01-02	-	-	+
BPX-375E-04-02-02	-	-	+
BPX-375E-04-02-03	-	-	+
BPX-375E-04-02-04	-	-	+
BPX-375E-04-03-02	-	-	+
BPX-375E-04-03-03	-	-	+
BPX-375E-04-08-01	-	-	+
BPX-375E-04-08-03	-	-	+
BPX-375E-04-08-04	-	-	+
BPX-375E-04-11-04	-	-	+
BPX-375E-04-12-02	-	-	+
BPX-375E-04-12-03	-	-	+
BPX-375E-04-12-04	-	-	+

¹ Padrão de Bandas observadas com o marcador “SSR 47

Tabela 2 Descrição dos tratamentos, reação fenotípica e resultado do padrão eletroforético utilizando o marcador molecular SSR-47

Genótipos	Nº de Plantas Avaliadas	Reação ¹		Padrão de Bandas Observadas ²		
		S	R	180 pb	180/191 pb	191 pb
LA-3473	20	0	20	-	-	+(20) ³
LA-3474	20	20	0	+(20)	-	-
LA-3475	20	20	0	+(20)	-	-
TEX-143	20	0	20	-	+(20)	-
BPX-373G-06-02-01	20	0	20	-	-	+(20)
BPX-373G-06-10-01	20	0	20	-	-	+(20)
BPX-373G-07-03-03	20	0	20	-	-	+(20)
BPX-374G-01-01-03	20	0	20	-	-	+(20)
BPX-374G-01-02-03	20	0	20	-	-	+(20)
BPX-374G-04-08-02	20	0	20	-	-	+(20)
BPX-374G-04-12-01	20	0	20	-	-	+(20)
BPX-375F-04-01-02	20	0	20	-	-	+(20)
BPX-375F-04-08-04	20	0	20	-	-	+(20)

¹S = Suscetível; R= Resistente; ² Padrão de Bandas observadas com o marcador “SSR 47”. ³ Número entre parênteses indica número de plantas avaliadas que apresentaram a(s) banda(s) indicada(s)

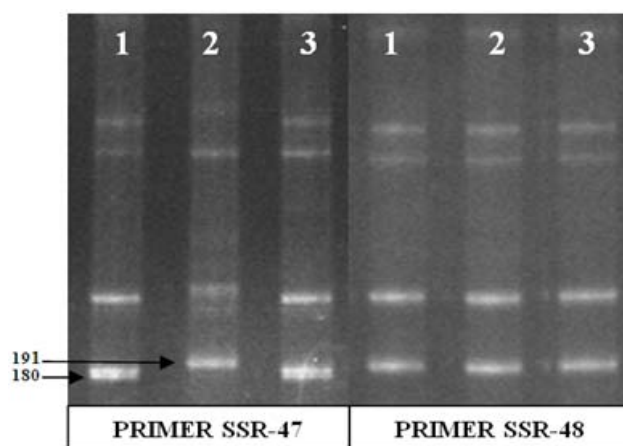


Figura 1 Padrão eletroforético de fragmentos de DNA amplificados para o marcador SSR-47 e SSR-48 em plantas de tomateiro; 1- LA- 3474, suscetível a begomovírus (isogênico a LA-3475); 2- LA-3473, resistente a begomovírus (isogênico a LA-3475); 3- LA-3475, suscetível a begomovírus

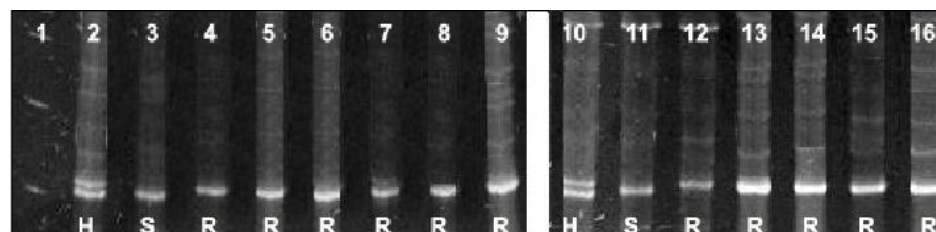


Figura 2 Padrão eletroforético de fragmentos de DNA amplificados para o marcador SSR-47 em plantas de tomateiro; 1- Ladder (100 pb); 2- TEX-143 PI#01; 3- LA-3474 PI#01; 4- LA-3473 PI#01; 5- BPX-373G-06-02-01 PI#01; 6- BPX-373G-06-10-01 PI#01; 7- BPX-373G-07-03-03 PI#01; 8- BPX-374G-01-01-03 PI#01; 9- BPX-374G-01-02-03 PI#01; 10- TEX-143 PI#02; 11- LA-3475 PI#01; 12- LA-3473 PI#02; 13- BPX-374G-04-08-02 PI#01; 14- BPX-374G-04-12-01 PI#01; 15- BPX-375F-04-01-02 PI#01; 16- BPX-375F-04-08-04 PI#01