

Marcador microssatélite associado ao alelo *Ty-1* de resistência a *Begomovirus* em tomateiro

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

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras (Ufla), Departamento de Biologia, Caixa Postal 3.037, CEP 37200-000 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 deste trabalho foi associar um marcador microssatélite ao alelo *Ty-1* de resistência a *Begomovirus* em tomateiro, e avaliar a eficiência desta associação na seleção de linhagens resistentes ao vírus. Os marcadores SSR-47 e SSR-48 foram testados em linhagens isogênicas contrastantes quanto à presença do alelo *Ty-1* (LA-3473, LA-3474, LA-3475). O marcador SSR-47, por ter detectado polimorfismo nas linhagens, foi o único utilizado nas etapas subsequentes da pesquisa. Detectada a associação entre o 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 a avaliação fenotípica das plantas com padrões contrastantes de bandas para SSR-47, quanto à resistência a *Begomovirus*. Plantas que apresentaram banda única de 191 pb foram resistentes ao *Begomovirus*, pelo teste de inoculação por enxertia; aquelas com banda única de 180 pb foram suscetíveis; e as plantas com bandas de 191 e 180 pb foram resistentes. A distância máxima entre o *Ty-1* e o marcador SSR-47 foi de 2,7 cM. Este marcador foi efetivo em caracterizar genótipos portadores do alelo *Ty-1*. As respostas das plantas à infecção pelo *Begomovirus*, induzida via enxertia, são consistentes com as reações previstas com o uso do marcador molecular SSR-47.

Termos para indexação: *Geminiviridae*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum lycopersicum*, QTL, seleção assistida por marcadores.

Microsatellite marker associated with the *Ty-1* allele for resistance to *Begomovirus* in tomato

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 the efficiency of this association 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 for the *Ty-1* allele. The marker SSR-47 detected polymorphism in the lines, and was the only one used in the subsequent research phases. 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. To confirm the selection efficiency, 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*, through inoculation test by 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. This marker was efficient to identify genotypes bearing the *Ty-1* allele. Plant responses to infection by *Begomovirus* inoculated through grafting were consistent with reactions predicted with the use of the SSR-47 marker.

Index terms: *Geminiviridae*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum lycopersicum*, QTL, marker assisted selection.

Introdução

As doenças conhecidas como geminiviroses causam perdas significativas à 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* L. syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.) é transmitido, principalmente, pelas moscas-brancas do gênero *Bemisia*. As espécies de *Begomovirus* podem apresentar genoma bipartido ou monopartido.

No Brasil, diversos surtos de geminiviruses foram observados em tomateiro, principalmente, após a introdução de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring e, atualmente, há diversas espécies de *Begomovirus* que infectam 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 causam redução da floração, paralisação no crescimento e consequente perda da 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 manejo químico da mosca-branca; entretanto, esse procedimento não é totalmente eficaz, em razão do aparecimento de populações resistentes a inseticidas (Gerling, 1990) e pelo fato de a doença ser diagnosticada em estádios avançados, na maioria das vezes (Silva et al., 2000). Dessa forma, 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 vêm 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* Dunal (Santana et al., 2001; Maruthi et al., 2003). Na Europa, acessos tolerantes a *Begomovirus* com genoma monopartido foram também tolerantes a alguns isolados com genoma bipartido (Santana et al., 2001; Matos et al., 2003), em consequência 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 disponíveis no mercado resultaram de melhoramento genético convencional. Em geral, para isso, são realizados vários cruzamentos e posterior fenotipagem dos indivíduos obtidos por meio de inoculações. Para diminuir essas dificuldades em fenotipar e selecionar os indivíduos desejados, principalmente quanto à resistência às doenças de natureza virótica (Menezes et al., 2004; El Mehrach et al., 2005), a identificação de marcadores moleculares ligados a alelos de resistência é um dos principais objetivos dos atuais programas de melhoramento 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., 2004). 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 –, com grande potencial como candidatos a marcadores associados a genes que contêm alelos de resistência a doenças. Informações sobre esses marcadores estão disponíveis no endereço eletrônico do “International Solanaceae Genome Project” (Sol Genomics Network, 2010).

O alelo *Ty-1*, que confere resistência a *Begomovirus*, 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 ao nematódeo-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), porém em fase de repulsão. Portanto, linhagens cuja resistência a *Begomovirus* é conferida pelo alelo *Ty-1* são presumivelmente suscetíveis a nematóides (*Mi*⁺).

O comprimento total do genoma do tomate foi estimado em aproximadamente 1.275 cM (Livingstone et al., 1999) e, mais recentemente em 1.356 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, é grande a possibilidade de se encontrarem marcadores microssatélites no cromossomo 6, associados ao alelo *Ty-1*, principalmente porque trabalhos têm demonstrado que boa parte dos marcadores microssatélites estão associados à região centromérica do genoma do tomateiro, na qual *Ty-1* está localizado (Areshchenkova & Ganai, 2002).

O objetivo deste trabalho foi associar um marcador microssatélite ao alelo *Ty-1*, que confere resistência a *Begomovirus* em tomate, e avaliar a eficiência desta associação na seleção de linhagens resistentes ao vírus.

Material e Métodos

Entre os mais de 600 pares de primers SSR (simple sequence repeat), desenvolvidos pela Universidade de Cornell (EUA) e disponíveis no Sol Genomics Network (2010), foram selecionados dois pares (SSR-47 e SSR-48) por estarem mapeados no cromossomo 6, próximo ao alelo *Mi* que, segundo Zamir et al. (1994), tem distância <1 cM do loco *Ty-1*. Dos dois pares de primers escolhidos, o que detectou polimorfismo nas linhagens foi utilizado como possível marcador para *Ty-1*.

Para a verificação da existência de polimorfismo, SSR-47 e SSR-48 foram primeiramente testados em linhagens isogênicas contrastantes quanto à 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, de constituição genotípica *Ty-1⁺/Ty-1⁺*, suscetível a geminivírus; LA-3473, de constituição genotípica *Ty-1/Ty-1*, resistente a geminivírus e isogênica a LA-3475; e LA-3474, de constituição genotípica *Ty-1⁺/Ty-1⁺*, suscetível a geminivírus e isogênica a LA-3475.

Para a verificação da existência ou não de polimorfismo entre os genótipos suscetíveis (*Ty-1⁺/Ty-1⁺*) e resistentes (*Ty-1/Ty-1*) a *Begomovirus*, foram coletados folíolos de cada planta, colocados em envelopes de plástico devidamente identificados e acondicionados em caixa de isopor com gelo, e imediatamente levados ao Laboratório Central de Biologia Molecular, da Universidade Federal de Lavras, onde se realizou a extração do DNA.

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

Para a reação em cadeia de polimerase (PCR), foi obtida uma mistura por amostra com: 2,5 µL de tampão PCR 10X; 0,75 µL MgCl₂ 50 mmol L⁻¹; 0,50 µL de dNTP 10 mmol L⁻¹; 1,25 µL de cada iniciador ("forward" e "reverse") 10 mmol L⁻¹; 0,25 µL Taq DNA polimerase (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EUA) 1 unidade; 1,0 µL de DNA 20-50 ng; 17,5 µL de água ultrapura autoclavada. A amplificação foi inicialmente conduzida por 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 45°C, e 2 min a 72°C. A reação final de elongação foi de 5 min a 72°C.

Para a realização da eletroforese, foram utilizados 11,5 µL do produto da PCR de cada amostra, pipetados em 4,0 µL de corante azul de bromofenol 1X.

A fixação dos fragmentos foi feita em gel de poliacrilamida a 15% e tampão TBE 1X. A coloração foi feita com brometo de etídeo, e as bandas no gel foram visualizadas à luz ultravioleta a 260 nm e fotografadas.

Os primers utilizados foram os obtidos pela Sol Genomics Network (2010): para o SSR-47, o iniciador "forward" TCC TCA AGA AAT GAA GCT CTG A e o "reverse" CCT TGG AGA TAA CAA CCA CAA; e para o SSR-48, "forward" ATC TCC TTG GCC TCC TGT TT e o "reverse" GTC ATG GCC ACA TGA ATA CG. Dos dois marcadores escolhidos, apenas o SSR-47 apresentou polimorfismo e, por isso, foi utilizado nas etapas subsequentes 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. Os padrões de bandas do marcador SSR-47, apresentados por plantas das populações BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E, foram comparados com os das testemunhas LA-3473 (*Ty-1/Ty-1*, homozigoto resistente), LA-3474 (*Ty-1⁺/Ty-1⁺*, homozigoto suscetível), LA-3475 (*Ty-1⁺/Ty-1⁺*, homozigoto suscetível) e TEX-143 (*Ty-1⁺/Ty-1*, heterozigoto resistente).

Novas linhagens de tomateiro foram obtidas a partir do cruzamento inicial da linhagem LA-3473 (suscetível a nematóide e resistente a geminivírus, *Mi⁺Ty-1/Mi⁺Ty-1*) com três diferentes linhagens de tomateiros homozigotas, para a resistência a nematóides e suscetibilidade a geminivírus (*Mi Ty-1⁺/Mi Ty-1⁺*). As linhagens resistentes a nematóides foram utilizadas como parentais recorrentes em três retrocruzamentos sucessivos, em cujas gerações segregantes sempre foram selecionadas plantas suscetíveis a nematóides (*Mi⁺/Mi⁺*), presumivelmente resistentes a *Begomovirus*, embora essa resistência não houvesse sido testada. Na geração F₄ do terceiro retrocruzamento, foi feita a seleção final, também quanto à suscetibilidade a nematóide (*Mi⁺/Mi⁺*), tendo-se obtido plantas cujas populações foram designadas pelos códigos BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E, respectivamente. A seleção quanto à suscetibilidade a nematóide (*Mi⁺/Mi⁺*) foi feita após inoculações de ovos de *Meloidogyne* spp. conforme Carvalho et al. (1999). A linhagem LA-3473, resistente a *Begomovirus* (*Mi⁺Ty-1/Mi⁺Ty-1*), foi utilizada em combinação a uma linhagem resistente a nematóide, reconhecidamente suscetível a geminivírus (*Mi Ty-1⁺/Mi Ty-1⁺*), na obtenção do híbrido TEX-143, presumivelmente de genótipo *Ty-1/Ty-1⁺*, ou seja,

resistente heterozigoto para *Ty-1*. Essas plantas foram testadas com o marcador SSR-47 presumivelmente associado ao alelo *Ty-1*.

Famílias F_5RC_3 , resultantes da autofecundação de plantas BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E, foram designadas respectivamente como BPX-373G, BPX-374G e BPX-375F, e testadas (20 plantas por família, com seleção direta e inoculação com vírus pelo processo de enxertia) quanto ao perfil de bandas gerado pelo marcador molecular SSR-47. Para isto, sementes BPX-373G, BPX-374G e BPX-375F foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células, com substrato comercial Plantmax, junto com as testemunhas LA-3473 (homozigota resistente a *Begomovirus*), LA-3474 (homozigota suscetível), LA-3475 (homozigota suscetível) e TEX-143 (híbrido presumivelmente resistente, heterozigoto – *Ty-1/Ty-1+*). Aos 28 dias após a semeadura, 20 plantas de cada família foram transplantadas para vasos de 1,5 L e infectadas pelo vírus, pelo processo de enxertia. Plantas de tomate da cultivar Santa Clara (suscetível a *Begomovirus*), foram utilizadas para a retirada de estacas com sintomas severos, coletadas da parte apical de plantas contaminadas com uma estirpe de *Begomovirus*. As estacas infectadas foram enxertadas em plantas assintomáticas a serem testadas. A inoculação por enxertia foi realizada após as plantas a serem testadas terem atingido o estágio fenológico ideal, de quatro a cinco folhas verdadeiras, ou 10 dias após o transplante. Aos 40 dias após enxertia, as 20 plantas testadas de cada família foram avaliadas como suscetíveis (S, com presença de sintomas) ou resistentes (R, ausência de sintomas). A temperatura da casa de vegetação variou de 27 a 35°C, e a umidade relativa do ar de 60 a 100%, no período em que foi realizado o experimento.

A distância genética entre o marcador SSR-47 e o alelo *Ty-1* foi estimada com base na frequência de plantas recombinantes encontrada durante os retrocruzamentos que levaram à obtenção das populações BPX-373F, BPX-374F, e BPX-375E. Quando não se encontravam plantas recombinantes (suscetíveis a nematóides – *Mi+*/*Mi+*, e com a banda SSR-47 correspondente à existente nas testemunhas *Ty-1+*/*Ty-1+* LA-3474 e LA-3475), estimava-se a distância máxima esperada entre esses alelos a 95% de probabilidade, por meio da expressão: $(1 - c)^n \geq 0,95$, em que n é o número de retrocruzamentos efetuados, igual a 3.

Resultados e Discussão

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

As testemunhas LA-3473 (*Ty-1/Ty-1*, homozigoto resistente), LA-3474 (*Ty-1+/Ty-1+*, homozigoto suscetível), LA-3475 (*Ty-1+/Ty-1+*, homozigoto suscetível) e TEX-143 (*Ty-1+/Ty-1*, heterozigoto resistente) 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 (Tabela 1), o que confirma que o marcador SSR-47 é do tipo codominante – uma das vantagens do marcador 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 191 pb, que caracteriza genótipos homozigotos resistentes (*Ty-1/Ty-1*), o mesmo padrão apresentado

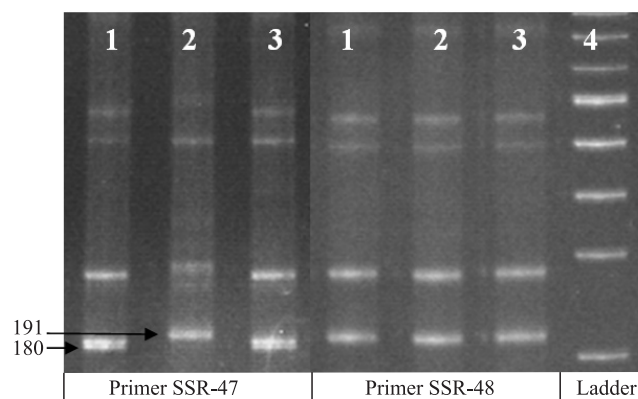


Figura 1. Padrão eletroforético de fragmentos de DNA amplificados para o marcador SSR-47 e SSR-48 em plantas de tomateiro; 1, LA-3474, suscetível a *Begomovirus* (isogênico a LA-3475); 2, LA-3473, resistente a *Begomovirus* (isogênico a LA-3475); 3, LA-3475, suscetível a *Begomovirus*. 4, Ladder (100 pb) (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EUA).

pela testemunha homocigota resistente LA-3473. Uma vez que durante o processo de sua obtenção foi utilizado apenas o critério de suscetibilidade a nematóides (Mi^+/Mi^+), fica evidente uma ligação gênica entre a reação a nematóides e o marcador SSR-47 utilizado.

Os locos *Mi*, *Ty-1* e SSR-47 estão localizados muito próximos entre si (Zamir et al., 1994; Sol Genomics Network, 2010), portanto, era de se esperar uma alta frequência de associação entre os genótipos de plantas suscetíveis a nematóides (Mi^+/Mi^+) e a presença de

Tabela 1. Resultado do padrão eletroforético, com uso do marcador molecular SSR-47, em famílias avançadas (genótipos) de tomateiro.

Genótipo	Padrão de bandas observadas		
	180 pb	180/191 pb	191 pb
LA-3473 (testemunha homocigota resistente)	-	-	+
LA-3474 (testemunha homocigota suscetível)	+	-	-
LA-3475 (testemunha homocigota suscetível)	+	-	-
TEX-143 (heterocigoto 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	-	-	+

banda única, de 191 pb. Dessa forma, não foi detectada nenhuma planta recombinante, isto é, suscetível a nematóides (Mi^+/Mi^+) e possuidora de banda, de 180 pb. Essa ausência de recombinantes, mesmo após os três retrocruzamentos utilizados para a obtenção das populações BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E, permitiu estimar a distância genética, entre *Mi* e o marcador SSR-47, em um valor máximo de c, 1,7 cM, a 95% de probabilidade, valor obtido pela expressão $(1 - c)^3 \geq 0,95$.

A distância de 1,7 cM está próxima da encontrada no mapa do tomateiro (1,0 cM), em que o alelo *Mi* está 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 *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 de $(1 + 1,7) = 2,7$ cM, com a distância entre *Mi* e o marcador SSR-47 de 1,7 cM. Quando se considera a distância de 1 cM, obtida pelo mapa do Sol Genomics Network (2010), tem-se $(1 + 1) = 2,0$ cM de distância, resultado obtido na hipótese de a sequência linear dos locos ser *Ty-1* → *Mi* → SSR-47. Na hipótese de a sequência linear dos locos ser *Mi* → *Ty-1* → SSR-47, a distância estimada entre *Ty-1* e o marcador SSR-47 seria de aproximadamente $(1,7 - 1) = 0,7$ cM, com a distância calculada, e de $(1 - 1) = 0,0$ cM, quando se considera a distância obtida pelo mapa. No presente ensaio, não foi 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 é bastante próxima da estimada pelo mapa do Sol Genomics Network (2010), o que indica a utilidade do marcador SSR-47 para a seleção assistida de plantas resistentes a *Begomovirus*.

Plantas F_4RC_3 das populações BPX-373F, BPX-374F e BPX-375E, previamente identificadas como portadoras da banda de 191 pb, normalmente associada ao genótipo *Ty-1/Ty-1*, tiveram suas respectivas famílias F_3RC_3 BPX-373G, BPX-374G e BPX-375F (20 plantas por família) testadas fenotipicamente quanto à resistência ao vírus, pelo processo de inoculação por enxertia e, genotipicamente, com o 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),

mostraram reação de resistência ao vírus, pois as brotações novas não apresentaram nenhum sintoma característico, o que as caracterizou como resistentes a *Begomovirus*. 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 homocigotas 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 diminuíram em razão do surgimento de brotações novas mais distantes do ponto de enxertia, e por isso foram classificadas como resistentes a *Begomovirus*. Essa ocorrência se explica pelo fato de o alelo *Ty-1* interferir na proteína viral responsável pela

circulação do vírus na planta (Zamir et al., 1994), o que dificulta a disseminação sistêmica das partículas virais do enxerto para as brotações mais novas da planta. Boiteux et al. (2007) verificaram que genótipos heterocigotos (*Ty-1/Ty-1⁺*) e homocigotos suscetíveis (*Ty-1⁺/Ty-1⁺*) apresentaram 35 e 95% respectivamente de plantas com sintomas de infecção por *Begomovirus*, após terem sido submetidos a condições de inóculo natural, em elevada densidade populacional de mosca-branca virulífera. Esses resultados são indicativos de que o alelo *Ty-1* é efetivo mesmo em heterocigose. No entanto, os autores não avaliaram genótipos homocigotos resistentes (*Ty-1/Ty-1*).

As reações fenotípicas de resistência e suscetibilidade a *Begomovirus* mostram perfeita concordância com

Tabela 2. Descrição dos tratamentos, reação fenotípica e resultado do padrão eletroforético, com uso do marcador molecular SSR-47.

Genótipo	Número 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)
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)

⁽¹⁾S, Suscetível; R, Resistente; ⁽²⁾Número entre parênteses indica número de plantas avaliadas que apresentaram a banda indicada.

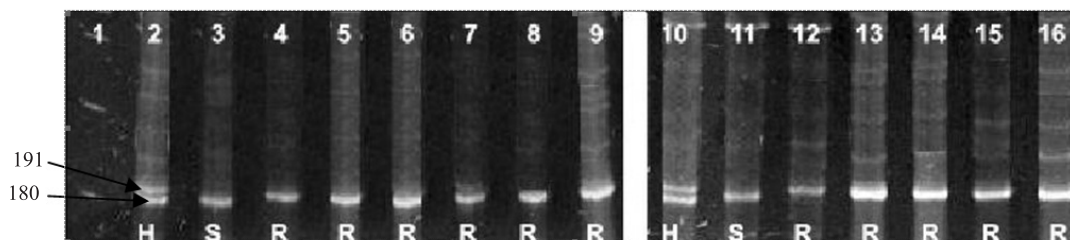


Figura 2. Padrão eletroforético de fragmentos de DNA, amplificados para o marcador SSR-47 em plantas de tomateiro; 1, Ladder (100 pb) (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EUA); 2, TEX-143; 3, LA-3474; 4, LA-3473; 5, BPX-373G-06-02-01; 6, BPX-373G-06-10-01; 7, BPX-373G-07-03-03; 8, BPX-374G-01-01-03; 9, BPX-374G-01-02-03; 10, TEX-143; 11, LA-3475; 12, LA-3473; 13, BPX-374G-04-08-02; 14, BPX-374G-04-12-01; 15, BPX-375F-04-01-02; 16, BPX-375F-04-08-04. H, heterocigoto; S, homocigoto suscetível; R, homocigoto resistente.

os resultados obtidos com o genótipo indicado pelo marcador SSR-47 (Tabela 2 e Figura 2). Esse fato e a distância bastante próxima estimada entre os locos *Ty-1* e SSR-47 permitem concluir que a seleção de plantas resistentes a *Begomovirus*, 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-1*, à distância estimada de no máximo 2,7 cM.
2. O marcador molecular SSR-47 apresenta utilidade para a caracterização de genótipos de tomateiro quanto à presença do alelo *Ty-1* de resistência a *Begomovirus*.
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 apresentam resistência a *Begomovirus*.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; à Universidade Federal de Lavras (Ufla); à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão; à Fundação de Desenvolvimento Científico e Cultural; à empresa HortiAgro Sementes S.A.; ao Laboratório Central de Biologia Molecular/Ufla; e ao Laboratório de Virologia Molecular/Ufla.

Referências

- ARESHCHENKOVA, T.; GANAL, M.W. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p.229-235, 2002.
- BARONE, A. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. Available at: <<http://www.fao.org/biotech/docs/Barone.pdf>>. Accessed on: 15 July 2009.
- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA, V.R.; SILVA, C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E. de N.; GIORDANO, L. de B. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.20-23, 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. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, p.593-607, 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.; GHARSALLAH CHOUCANE, S.; MEJIA, L.; WILLIAMSON, V.M.; VIDAUSKI, F.; HATIMI, A.; SALUS, M.S.; MARTIN, C.T.; MAXWELL, D.P. PCR-based methods for tagging the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germoplasm. **Acta Horticulturae**, v.695, p.263-270, 2005.
- FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminiviruses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 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**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.
- GERLING, D. **Whiteflies: their bionomics, pest status and management**. Andover: Intercept, 1990. 348p.
- LIVINGSTONE, K.D.; LACKNEY, V.K.; BLAETH, J.R.; WIJK, R. van; 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 leaf curl 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.; LOURENÇO, 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**, v.28, p.159-165, 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 tospovírus (TSWV). **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.1-324, 2004. Suplemento.
- MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. **Virus Research**, v.71, p.123-134, 2000.
- RITSCHER, P.S.; LINS, T.C de L.; TRISTAN, R.L.; BUSO, G.S.C.; BUSO, J.A.; FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Biology**, v.4, p.9-23, 2004.

- SANTANA, F.M.; RIBEIRO, S. da G.; MOITA, A.W.; MOREIRA JUNIOR, D.J.; GIORDANO, L. de B. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. **Euphytica**, v.122, p.45-51, 2001.
- SILVA, J.B. da; GIORDANO, L. de B; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L. da S.; FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A. de; MAROUELLI, W.; SILVA, W.L.C. e; LOPES, C.A., ÁVILA, A.C.; NASCIMENTO, W.M.; PEREIRAI, W. Cultivo do tomate para industrialização. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. (Embrapa Hortaliças. Sistema de produção, 3). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/doencas_virus.htm>. Acesso em: 24 maio 2009.
- SOL GENOMICS NETWORK. International Solanaceae Genome Project (SOL): systems approach to diversity and adaptation. Available at: <<http://solgenomics.net/solanaceae-project/index.pl>>. Accessed on: 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**, v.88, p.141-146, 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.

Recebido em 14 de setembro de 2010 e aprovado em 20 de abril de 2011