



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**ESTUDOS COM O LOCUS *Ty-1* DO TOMATEIRO E BUSCA
POR NOVOS MARCADORES MOLECULARES PARA
TOLERÂNCIA AO *Tomato severe rugose virus*.**

DANIELA DAMASCENO XAVIER FERRO

Brasília – DF

2013

DANIELA DAMASCENO XAVIER FERRO

**ESTUDOS COM O LOCUS *Ty-1* DO TOMATEIRO E BUSCA POR NOVOS
MARCADORES MOLECULARES PARA TOLERÂNCIA AO *Tomato severe rugose*
virus.**

Dissertação apresentada
à Universidade de Brasília
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Fitopatologia pelo
Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia.

Orientador

Dr. Leonardo Silva Boiteux

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferro, Daniela Damasceno Xavier.

Estudos com o locus *Ty-1* do tomateiro e busca por novos marcadores moleculares para tolerância ao *Tomato severe rugose virus*./ Daniela Damasceno Xavier Ferro.

Brasília, 2013.

119p.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Resistência genética – Begomovírus.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Estudos com o locus *Ty-1* do tomateiro e busca por novos marcadores moleculares para tolerância ao *Tomato severe rugose virus*.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força, sabedoria, paciência, oportunidade, por ter uma família tão especial sempre ao meu lado, enfim por todas as bênçãos, não me canso de agradecer a Ele.

Ao Dr. Leonardo Silva Boiteux pela orientação e Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca pela co-orientação. Obrigada pelos ensinamentos, atenção, confiança e por me proporcionar essa oportunidade de trabalhar com vocês e aprender tanto.

Aos membros da banca examinadora, Renato Resende, Érico Dianese e Simone Ribeiro, pela cuidadosa revisão deste trabalho.

Ao Antônio W. Moita por ter cooperado para a realização de parte deste trabalho.

Ao meu marido, amigo, companheiro Flávio Elias. Agradeço pelo apoio, amor, compreensão, paciência, por não medir esforços para que meus sonhos se realizem e por sonhar comigo. Agradeço também por ajudar na formatação deste trabalho e de tanto outros no decorrer do curso.

Aos meus pais, Joária e Edson, ao meu irmão Rodrigo, simplesmente por estarem ao meu lado e por todo amor que sempre recebi. Agradeço a Lud, minha irmã de coração, por me escutar, aconselhar e compartilhar comigo todos os momentos bons e ruins. Amo muito vocês.

À toda minha família, tios, primos, agregados, especialmente aos Damasceno(s), pelos momentos divertidos e pela união.

Ao técnico de laboratório Antônio Francisco Costa (Chico Bucha) e ao analista José Getúlio pela cooperação e pelos ensinamentos. Agradeço também ao técnico William pela colaboração.

Às companheiras e amigas do laboratório de Genômica do CNPH, Mariana Machado, Niday Alline e Maria do Desterro pelos momentos alegres, que tornaram mais agradável o ambiente de trabalho.

Aos professores, funcionários e técnicos do curso de Pós-graduação em Fitopatologia, especialmente ao Ribamar, que sempre esteve pronto a me ajudar.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação, Fabi, Vanessinha, Samara, Nancy, Amanda, Lorena, Larissa, Cléia, Guilherme, Lúcio e Fred.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de ingressar na pós-graduação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Embrapa Hortaliças pela infraestrutura para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Dr. Leonardo Silva Boiteux**, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e institucional da Embrapa Hortaliças.

**ESTUDOS COM O LOCUS *Ty-1* DO TOMATEIRO E BUSCA POR NOVOS
MARCADORES MOLECULARES PARA TOLERÂNCIA AO *Tomato severe rugose*
virus.**

DANIELA DAMASCENO XAVIER FERRO

DISSERTAÇÃO APROVADA em __/__/__ por:

Dr. Érico de Campos Dianese
Examinador (Membro Externo)

Dr. Renato de Oliveira Resende
Examinador (Membro Interno)

Dr. Leonardo Silva Boiteux
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2013

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. PLANTA HOSPEDEIRA: TOMATEIRO	6
1.1. Origem botânica.....	6
1.2. Características botânicas do tomateiro.....	9
1.3. Consumo e valor nutricional do tomate e seus produtos.....	10
1.4. Dados econômicos do cultivo do tomateiro no Brasil.....	11
2. ESPÉCIES DE BEGOMOVÍRUS E AS BEGOMOVIROSES	13
2.1. Aspectos gerais.....	13
2.2. Estratégias gerais de controle e resistência genética aos begomovírus.....	15
3. O VETOR <i>Bemisia tabaci</i>	18
4. VARIABILIDADE GENÉTICA DOS BEGOMOVÍRUS	19
5. MARCADORES GENÉTICOS	22
5.1. Marcadores morfológicos.....	22
5.2. Marcadores moleculares.....	23
5.2.1. Marcadores bioquímicos.....	24
5.2.1.1. Isoenzimas.....	24
5.2.2. Marcadores de DNA.....	25
5.2.2.1. Marcadores baseados em enzimas de restrição e hibridação de sequências de DNA.....	25
5.2.2.1.1. RFLPs (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	25
5.2.2.1.2. Minissatélites.....	26
5.2.2.2. Marcadores baseados em PCR.....	27
5.2.2.2.1. RAPDs (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>).....	27
5.2.2.2.2. SCARs (<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i>).....	28
5.2.2.2.3. Microssatélites (<i>Simple Sequence Repeat</i>).....	29
5.2.2.2.4. AFLPs (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>).....	30
5.2.2.2.5. CAPS (<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>).....	31

6. APLICAÇÕES DOS MARCADORES DE DNA NO MELHORAMENTO DE PLANTAS.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 2: EFEITO DE DOSAGEM DA REGIÃO GENÔMICA	
CONTENDO O LOCUS <i>Ty-1</i> NA EXPRESSÃO DA RESISTÊNCIA AO <i>Tomato severe rugose virus</i> (GÊNERO <i>Begomovirus</i>) EM TOMATEIRO.....	
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1. Local de condução dos ensaios.....	48
2.2. Obtenção de uma população segregante para o locus <i>Ty-1</i>	48
2.3. Semeadura, transplântio, inoculação, avaliação e confirmação do inóculo.....	49
2.4. Extração de DNA de plantas da população segregante para o locus <i>Ty-1</i>	50
2.5. Reação de PCR e clivagem com enzima de restrição para geração de marcadores codominantes do tipo “ <i>cleaved amplified polymorphic sequence</i> ” (CAPS)	51
2.6. O padrão de segregação dos marcadores codominantes do tipo “ <i>cleaved amplified polymorphic sequence</i> ” (CAPS).....	52
3. RESULTADOS.....	53
3.1. Caracterização fenotípica da reação ao ToSRV.....	53
3.2. Caracterização genotípica e padrão de segregação de um marcador CAPS ligado ao locus <i>Ty-1</i>	55
3.3. Padrão de segregação para a resposta ao ToSRV.....	56
3.4. Associação entre fenótipo de resistência/tolerância ao ToSRV e a configuração alélica do marcador CAPS codominante na primeira avaliação (44 DAI)	57
3.5. Associação entre fenótipo de resistência/tolerância ao ToSRV e a configuração alélica do marcador CAPS codominante na segunda avaliação (87 DAI).....	58
4. DISCUSSÃO.....	60
5. CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MARCADORES	
RAPD/SCAR PARA MONITORAR DOIS EVENTOS DE INTROGRESSÃO DO	
LOCUS <i>Ty-1</i> (RESISTÊNCIA A BEGOMOVÍRUS) DE <i>Solanum chilense</i> EM	
TOMATEIRO.....	69
1. INTRODUÇÃO.....	72

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1. Características das linhagens isogênicas, desenvolvimento e avaliação para resistência ao <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) de duas populações segregantes.....	78
2.2. Extração de DNA genômico de linhagens parentais e indivíduos das populações segregantes.....	79
2.3. Genotipagem das linhagens parentais da população #1 para marcadores ligados ao locus <i>Ty-1</i>	80
2.4. Genotipagem das linhagens parentais da população #2 para marcadores ligados ao locus <i>Ty-3</i>	81
2.5. Avaliação das linhagens parentais das populações #1 e #2 com uma coleção de primers RAPD.....	82
2.6. Validação com uma amostra da população #1 de marcadores RAPD polimórficos entre os parentais.....	83
2.7. Validação com uma amostra da população #2 de marcadores RAPD polimórficos entre os parentais.....	83
2.8. Purificação de amplicons RAPD polimórficos para a população #1.....	83
2.9. Clonagem dos amplicons RAPD polimórficos para a população #1.....	84
2.10. Sequenciamento dos amplicons clonados.....	84
2.11. Desenho dos <i>primers</i> e condições de PCR para identificação dos potenciais marcadores SCAR.....	85
2.12. Análise dos prováveis recombinantes para a região englobando o locus <i>Ty-1</i> na população #1.....	86
2.13. Elaboração do mapa de genético e do mapa físico englobando a avaliação fenotípica da resistência a ToSRV dos indivíduos da população #1, os novos marcadores SCAR e RAPD e outros marcadores ligados ao locus <i>Ty-1</i> no cromossomo 6.....	87
3. RESULTADOS.....	88
3.1. Genotipagem das linhagens parentais das populações #1 e #2 para marcadores ligados aos loci <i>Ty-1</i> , <i>Mi</i> e <i>Ty-3</i>	88
3.2. Genotipagem da população #1.....	89
3.3. Análise e seleção dos possíveis marcadores RAPD.....	90
3.3.1. Etapas de seleção de primers RAPD promissores para mapeamento do locus <i>Ty-1</i> na população #1.....	90

3.3.2. Etapas de seleção de marcadores RAPD na população #2.....	91
3.3.3. Características dos <i>primers</i> RAPD selecionados para mapeamento do locus <i>Ty-1</i> na população #1.....	93
3.4. Análise dos <i>primers</i> /marcadores SCAR.....	96
3.4.1. Características do marcador molecular gerado pelo primer SCAR-C19.....	100
3.5. Análise dos potenciais recombinantes e distância genética (cM) dos <i>primers</i> SCAR-C19 e UW <i>Ty-1</i>	104
3.6. Mapa físico dos marcadores no Cromossomo 6.....	106
4. DISCUSSÃO.....	107
4.1. O mapeamento genético e físico dos marcadores ligados ao locus <i>Ty-1</i>	109
5. CONCLUSÕES.....	112
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
CONCLUSÕES GERAIS.....	118

RESUMO GERAL

FERRO, Daniela Damasceno Xavier. **Estudos com o locus *Ty-1* do tomateiro e busca por novos marcadores moleculares para tolerância ao *Tomato severe rugose virus***. 2013. 119p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes no Brasil, sendo também uma das culturas que mais sofrem danos pelo ataque de diversos patógenos, com especial destaque para as diferentes espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*). Um dos métodos de controle mais promissores tem sido o uso de cultivares contendo genes de resistência. O locus dominante *Ty-1* (introgridido da espécie selvagem *S. chilense*) tem sido a principal fonte de resistência empregada nos programas de melhoramento genético no mundo. Acessos e linhagens contendo o locus *Ty-1* apresentam resistência/tolerância a begomovírus monopartidos do complexo do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e para alguns vírus do complexo de espécies de genoma bipartido presente no Brasil, incluindo o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito na expressão fenotípica da resistência em tomateiros com distintas dosagens/configurações alélicas do locus *Ty-1* (homozigotas dominantes, heterozigotas e homozigotas recessivas) após inoculação com um isolado de ToSRV (**Capítulo 2**) e identificar em duas populações de mapeamento marcadores RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”) e/ou SCAR (“*Sequence Characterized Amplified Region*”) robustos e com ampla utilização em sistemas de seleção assistida de diferentes eventos de introgressão do locus *Ty-1* (**Capítulo 3**). As notas de severidade atribuídas às plantas que continham o locus dominante *Ty-1* em dupla dosagem (homozigotas resistentes) foram significativamente mais baixas do que as que continham apenas uma cópia do locus (heterozigotas). Por sua vez, plantas heterozigotas apresentaram notas mais baixas que as plantas duplo-recessivas (*ty-1/ty-1*). Os resultados indicam aos programas de melhoramento do tomateiro que híbridos com uma melhor expressão fenotípica da tolerância/resistência ao ToSRV devem, sempre que possível, apresentar o alelo dominante *Ty-1* em homozigose. No Capítulo 3, seis *primers* RAPD foram selecionados gerando polimorfismos para a região contendo o locus *Ty-1* exclusivamente para população #1; quatorze foram exclusivamente polimórficos na população #2 e nove detectaram polimorfismos nas duas populações. Um marcador SCAR codominante (heteroduplex) foi gerado a partir do marcador RAPD OPC-19. A análise de sequência e sua ancoragem no genoma do tomateiro confirmaram que esse marcador está localizado na mesma região do locus *Ty-1* no cromossomo 6, recomendando o seu uso em sistemas de

seleção assistida.

Palavras-chave: *Begomovirus*, efeito de dosagem, marcadores RAPDs/SCARs, *Solanum lycopersicum*.

Orientador: Leonardo Silva Boiteux – Embrapa Hortaliças.

GENERAL ABSTRACT

FERRO, Daniela Damasceno Xavier. **Studies with the tomato locus *Ty-1* and search for new molecular markers for *Tomato severe rugose virus* tolerance.** 2013. 119p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – University of Brasília, Brasília, DF.

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important vegetable crops in Brazil and it is also the one that suffer the most with the attack of many pathogens, especially virus species from the genus *Begomovirus* (*Geminiviridae* family). The most promising control strategy has been the employment of cultivars with resistance/tolerance genes to this group of pathogens. The dominant locus *Ty-1* (introgressed from the wild species *S. chilense*) has been one of the most important sources of resistance in tomato breeding programs throughout the world. Accessions and inbred lines carrying this locus display high levels of resistance to monopartite begomovirus species of the *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) complex and also against some viruses of the bipartite species complex from Brazil, including *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). The objectives of the present work were to evaluate the effect on the phenotypic expression after inoculation with one ToSRV isolate in tomato plants carrying distinct dosages/allelic states of the locus *Ty-1* (homozygous resistant, heterozygous, and homozygous recessive) (**Chapter 2**) and to identify in two mapping populations novel and robust RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”) and/or SCAR (“*Sequence Characterized Amplified Region*”) markers linked to *Ty-1* that would be suitable for employment in distinct assisted-selection programs (**Chapter 3**). The group of plants with double dominant locus dosage (homozygous resistant) had a disease grade significantly lower than that of heterozygous plants in both evaluations. Heterozygous plants had also superior performance when compared with plants displaying double recessive locus dosage (*ty-1/ty-1*). Our results indicate to breeding programs that F₁ hybrids should have, whenever possible, both parental lines with the *Ty-1* locus in homozygous condition in order to have the best phenotypic expression of tolerance/resistance against ToSRV isolates. In Chapter 3, six RAPD primers were selected due to the presence of polymorphic amplicons for the genomic region encompassing the locus *Ty-1* exclusively for population #1; fourteen primers were able to detect polymorphic amplicons exclusively in population #2 and nine were able to detect polymorphic markers in both populations. One SCAR amplicon (derived from RAPD OPC-19) generated a marker with a peculiar heteroduplex and codominant pattern. The sequence analysis of the SCAR allowed us to anchor this marker in the physical map that corresponds

to a region where the *Ty-1* locus resides on tomato chromosome 6. Therefore, the use of this marker can be also recommended for employment in marker-assisted selection systems.

Key-words: *Begomovirus*, dosage effect, RAPDs/SCARs markers, *Solanum lycopersicum*.

Advisor: Leonardo Silva Boiteux – Embrapa Vegetable Crops.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é a principal hortaliça produzida no Brasil, sendo cultivado em todas as regiões brasileiras. Entre os maiores Estados produtores destacam-se Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia (IBGE, 2012; Melo *et al.*, 2009). O cultivo do tomateiro durante todas as épocas do ano e em distintas condições edafoclimáticas propicia condições favoráveis ao ataque de pragas e patógenos tanto para lavouras destinadas ao consumo *in natura*, como para indústria (Souza & Reis, 2003). Dentre as principais doenças, aquelas causadas por espécies de *Begomovirus* têm sido limitantes à produção comercial do tomateiro em diversas regiões no mundo (Polston & Anderson, 1997; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Navas-Castillo *et al.*, 2011). Os *Begomovirus* pertencem à família *Geminiviridae*, possuem DNA circular fita simples e podem apresentar um ou dois componentes genômicos (monopartidos ou bipartidos), denominados DNA-A e DNA-B (Stanley, 2005). Esses vírus são disseminados de maneira muito eficiente por um complexo de espécies relacionadas com *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (De Barro *et al.*, 2011). Somente a partir da década de 1990, com a introdução no Brasil de *Bemisia tabaci* biótipo B, que foi observado o aumento na incidência e severidade de begomovirose em campos de tomateiro, bem como o aumento na diversidade de espécies e número de recombinantes entre elas (Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003). Várias espécies de begomovírus têm sido relatadas em tomateiro, sendo duas predominantes: *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) (Fernandes *et al.*, 2008). Além disso, existe a permanente ameaça da introdução no Brasil de espécies de genoma monopartido pertencentes ao complexo viral *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), fato ainda não observado (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008; Fernandes, 2010). Os principais sintomas induzidos por esses vírus em tomateiro são enrolamento da folha, epinastia, mosaico-dourado, rugosidade, clorose das nervuras e também clorose internerval, mosqueado e nanismo que resultam em redução da floração, redução no ‘pegamento’ de frutos, paralisação no crescimento e consequente perda na produção (Zhou *et al.*, 2008).

Nenhuma estratégia de controle, quando utilizada isoladamente, tem demonstrado ser efetiva para as doenças causadas por begomovírus. O controle químico das moscas-brancas é prejudicado pela constante migração de grandes populações do inseto de lavouras mais velhas para as mais novas (Harrison, 1985), além disso, recentemente tem sido relatada resistência da mosca-branca a inseticidas (Horowitz *et al.*, 2007), ressaltando a necessidade por buscas de

estratégias de manejo alternativas e com maior eficiência, como melhoramento de cultivares de tomate para resistência ao vírus. A principal estratégia de melhoramento tem sido à busca de fontes com amplo espectro de resistência e/ou a “piramidização” de diferentes genes de resistência em linhagens-elite. Enquanto os tomateiros domesticados (*S. lycopersicum*) são suscetíveis aos begomovírus, altos níveis de resistência foram encontrados em várias espécies selvagens de tomate, incluindo *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. habrochaites* e *S. cheesmaniae* (Ji *et al.*, 2007a). Os genes/loci de resistência caracterizados em espécies selvagens são os dominantes e/ou semi-dominantes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4* e *Ty-5* e os genes/loci recessivos *tcm-1*, *tgr-1* e *ty-5*. O locus *Ty-1* se mostrou efetivo contra diferentes isolados de diferentes espécies de *Begomovirus* em vários continentes (Zamir *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 2005a; Boiteux *et al.*, 2007a). O locus *Ty-2* vem se mostrando com boa eficiência contra isolados brasileiros quando inoculados via mosca-branca (Boiteux *et al.*, 2007b). O gene/locus *Ty-3* confere alto nível de resistência a TYLCV e resistência intermediária a isolados de espécies de genoma bipartido na Flórida (Ji *et al.*, 2007). O locus *Ty-4* foi introgridido de *S. chilense* e o locus *Ty-5* de *S. peruvianum*. O gene recessivo *tcm-1* (derivado de *S. lycopersicum* ‘Tyking’) tem se mostrado efetivo contra begomovírus de genoma bipartido do Brasil (Giordano *et al.*, 2005b) e monopartido da Europa (García-Cano *et al.*, 2008). ‘FLA653’ é a linhagem fonte do gene recessivo *tgr-1* que deriva de cruzamentos múltiplos envolvendo *S. chilense* ‘LA-2779’ e ‘Tyking’ (Boiteux *et al.*, 2012). Mais recentemente, um gene de resistência também de natureza recessiva foi caracterizado (em distintas linhagens derivadas de ‘Tyking’) conferindo resistência a isolados de TYLCV na Flórida. Esse gene (localizado no cromossomo 4 de *S. lycopersicum*) foi denominado como *ty-5* (Hutton *et al.* 2012).

Poucas fontes de resistência aos begomovírus vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de cultivares comerciais e, dessas, a mais comum é a conferida pelo gene/locus *Ty-1* (Santana *et al.*, 2001; Maruthi *et al.*, 2003). O locus *Ty-1* foi mapeado e posicionado no topo do cromossomo 6, próximo da região do centrômero (De Castro *et al.*, 2007; Verlaan *et al.*, 2011). Esse locus está ligado em repulsão com gene *Mi* que confere resistência a diferentes espécies de nematóides do gênero *Meloidogyne* em uma região conhecida pelos baixos níveis de recombinação (Zamir *et al.*, 1994).

No melhoramento genético convencional, são realizados vários cruzamentos e posterior fenotipagem dos indivíduos após inoculação com o patógeno que se deseja estudar, o que demanda muito tempo e recursos. Para diminuir essas dificuldades e aumentar a escala dos processos de fenotipagem e seleção, a disponibilidade de marcadores moleculares ligados

a genes de resistência se torna uma das principais ferramentas para os atuais programas de melhoramento genético (Barone *et al.*, 2009; Boiteux *et al.*, 2012). O desenvolvimento de mapas genéticos extremamente densos (com um número elevado de marcadores) tem permitido a localização genômica/isolamento de genes e o uso de diversos marcadores moleculares em programas de melhoramento com seleção assistida (Pillen *et al.*, 1996; Foolad, 2007; Barone *et al.*, 2009).

Visando dar suporte aos programas de melhoramento do tomateiro, o presente trabalho teve os objetivos de estudar a influência do locus *Ty-1* na expressão fenotípica do *Tomato severe rugose virus* e o efeito de dosagem desse gene nessa característica. Para isso foi utilizada uma população F₂, segregante quanto ao fator de resistência e proveniente do cruzamento de duas isolinhas (LAM144 R x LAM144 S). Esses experimentos demonstraram a natureza semi-dominante do locus *Ty-1* e sua associação aos níveis elevados de resistência/tolerância ao ToSRV. Esses resultados indicam que essa região do genoma do tomateiro apresenta um fator (ou grupamento de fatores genéticos) que controla um amplo espectro de tolerância/resistência contra distintas espécies do gênero *Begomovirus*, incluindo espécies predominantes nas condições Neotropicais. Os resultados também indicam aos programas de melhoramento do tomateiro que híbridos com uma melhor expressão fenotípica da tolerância/resistência ao ToSRV devem, sempre que possível, apresentar o alelo dominante *Ty-1* em homozigose.

Outro objetivo foi buscar marcadores moleculares do tipo RAPD e SCAR fortemente ligados ao locus *Ty-1*. Com esse intuito, foram utilizadas duas populações de mapeamento provenientes do cruzamento de isolinhas, ou seja, mesmo *background* genético contrastando apenas em relação à presença ou não desse fator de resistência. As duas populações foram derivadas de distintos eventos de introgressão de *S. chilense*: a população #1 (LAM 144 R x LAM144 S) e a população #2 (LAM162 Ty x LAM162 Mi). Dez amplicons RAPD polimórficos e estáveis associados com a resistência foram purificados e sequenciados. Um marcador SCAR codominante (heteroduplex) foi gerado a partir do marcador OPC-19₈₀₀. Essa coleção de novos marcadores identificada na presente dissertação pode ser empregada para aumentar a densidade de marcadores em torno do loci *Ty-1* e *Ty-3*, auxiliando em futuros trabalhos de clonagem posicional desse(s) fator(es) de resistência.

OBJETIVO GERAL

Amparar programas de melhoramento do tomateiro, através de estudos sobre o importante locus *Ty-1*, que confere resistência/tolerância a diferentes espécies de begomovírus, envolvendo análise da expressão fenotípica, estudo do efeito de dosagem e a busca por marcadores moleculares ligados a essa região genômica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de dosagem do gene/locus *Ty-1* na expressão fenotípica da resistência/tolerância, em plantas de tomateiro, a um isolado de *Tomato severe rugose virus* – ToSRV (uma das principais espécies virais de genoma bipartido presentes no Brasil), utilizando uma população F_2 derivada do cruzamento de duas linhagens isogênicas que segregam para esse segmento do genoma do tomateiro.
- Identificar novos marcadores RAPD e SCAR ligados à região genômica contendo os loci *Ty-1* e/ou *Ty-3* em duas populações F_2 segregantes para o/os locus/loci de interesse, com eventos de introgressão distintos.
- Localizar fisicamente os marcadores identificados no genoma do tomateiro disponível no SOL Genomics Website (<http://solgenomics.net>).

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. PLANTA HOSPEDEIRA: O TOMATEIRO

1.1. Origem botânica

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é originário da região dos Andes, tendo distribuição desde o norte do Chile até a Colômbia. As espécies geneticamente relacionadas com o tomateiro têm amplitudes de distribuição bem definidas dentro do centro de origem do gênero, exceto o ancestral selvagem *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (tomate-cereja) que pode ser encontrado em praticamente toda América tropical e subtropical (Warnock, 1988). Essa hortaliça foi inicialmente cultivada na região de Puebla e Vera Cruz no México. Com a colonização das Américas (século XVI) o tomate foi levado para a Europa, inicialmente para a Espanha e Itália, países nos quais se adaptou facilmente, devido ao clima ameno do Mediterrâneo.

Atualmente o tomateiro é cultivado e consumido em todos os continentes (Silva & Giordano, 2000). De fato, o tomate é uma das espécies de maior importância global, apresentando diferentes segmentos para atender às mais diversas demandas de mercado (Silva & Giordano, 2000). No Brasil, a introdução do tomate foi feita pelos imigrantes europeus (italianos, espanhóis e portugueses) no final do século XIX. Na verdade, a difusão e o incremento no consumo no país começaram a ocorrer apenas depois da Primeira Guerra Mundial, por volta de 1930 (Alvarenga, 2004).

O tomateiro e suas espécies silvestres são plantas dicotiledôneas, da ordem *Solanales*, do gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*) pertencente à família *Solanaceae*. Essa é uma família botânica extremamente diversificada que engloba, atualmente, cerca de 90 gêneros e 1700 espécies (Weese & Bohs, 2007). Carl Von Linnaeus (1753) classificou o tomateiro, inicialmente dentro do gênero *Solanum*. No entanto, em 1754, o botânico Milller sugeriu a mudança para dentro de um gênero distinto *Lycopersicon*, ficando a nomenclatura da espécie *L. esculentum* L. (Mill.). O gênero tem sido historicamente subdividido em dois subgêneros:

Eulycopersicon (de frutos maduros vermelhos) e *Eriopersicon* (de frutos maduros não vermelhos). Mais recentemente, as espécies componentes do gênero *Lycopersicon* foram desmembradas e/ou reclassificadas (Peralta *et al.*, 2001; Spooner *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 2005b). Esses estudos foram conduzidos tendo como base em evidências obtidas a partir de estudos filogenéticos utilizando análise de seqüência de DNA (Spooner *et al.*, 2005) e após estudos mais aprofundados de morfologia e de distribuição geográfica, há ampla aceitação entre taxonomistas, melhoristas e geneticistas da atual nomenclatura *Solanum lycopersicum* (Peralta *et al.*, 2001; Spooner *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 2005b).

Na **Tabela 1** estão apresentadas as 17 espécies atualmente reconhecidas dentro do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) mais estreitamente relacionadas com o tomateiro cultivado, sendo que a maioria destas é silvestre e não é utilizada na agricultura, pois não apresentam características desejáveis. Contudo, muitas dessas espécies selvagens têm sido exploradas em programas de melhoramento para incorporação de caracteres de resistência a pragas e doenças, tolerância a fatores abióticos ou de aspectos nutricionais (Giordano *et al.*, 2003; Gordillo *et al.*, 2008).

No ponto de vista prático da exploração da base genética, as espécies do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) podem ser agrupadas em dois “complexos” de acordo com o grau de facilidade de cruzamento natural com a espécie cultivada, *S. lycopersicum* (Rick, 1983). No “complexo esculentum” as espécies cruzam mais facilmente com *S. lycopersicum*, enquanto espécies do “complexo peruvianum” apresentam uma série de barreiras no cruzamento com estes acessos (Rick *et al.*, 1990). Nos cruzamentos interespecíficos ocorre incompatibilidade de endosperma, que não se desenvolve, resultando no abortamento do embrião quando acessos de *S. lycopersicum* são utilizados como genitores femininos (Ehlenfeldt & Hanneman, 1992). A utilização de acessos de *S. lycopersicum* como genitores masculinos de acessos do “complexo *peruvianum*” resultam, quase sempre, em

incompatibilidade. Com isso, em cruzamentos interespecíficos com espécies silvestres é recomendável que se utilize a espécie cultivada como genitor feminino (Boiteux et al., 2012).

Tabela 1 – Listagem de espécies de tomate e equivalentes no previamente reconhecido gênero *Lycopersicon*, cor dos seus frutos e modo de reprodução de cada espécie (modificado de Peralta et al., 2006).

Nome da espécie do gênero <i>Solanum</i>	Equivalente <i>Lycopersicon</i>	Cor do Fruto	Tipo de Reprodução
<i>S. lycopersicoides</i> Dunal	<i>L. lycopersicoides</i> (Dunal in DC.) A. Child ex J.M.H. Shaw	Amarelo esverdeado no amadurecimento, preto quando maduro	AI, alógama
<i>S. sitiens</i> I.M. Johnst.	<i>L. sitiens</i> (I.M. Johnst.) J.M.H. Shaw	Amarelo esverdeado no amadurecimento, preto quando maduro	AI, alógama
<i>S. juglandifolium</i> Dunal	<i>L. ochranthum</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	Verde a amarelo esverdeado	AI, alógama
<i>S. ochranthum</i> Dunal	<i>L. juglandifolium</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	Verde a amarelo esverdeado	AI, alógama
<i>S. pennellii</i> Correll	<i>L. pennellii</i> (Correll) D'Arcy	Verde	Geralmente AI, algumas AC
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D.M Spooner	<i>L. hirsutum</i> Dunal	Verde com listras verdes escuras	Tipicamente AI
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> Dunal	Verde a verde esbranquiçado, com listras roxas	AI, alógama
<i>S. huaylasense</i> Peralta & S. Knapp	Desmembrado de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller	Verde com listras verdes escuras	Tipicamente AI, alógama
<i>S. peruvianum</i> L.	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller	Tipicamente verde a verde branco, algumas vezes lavados com roxo	Tipicamente AI, alógama
<i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr. (uma raça geográfica: Misti nr. Arequipa).	Desmembrado de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller; também conhecido como <i>L. glandulosum</i> C.F. Müll.	Tipicamente verde com listras verde escuras ou roxas, algumas vezes lavadas com roxo	Tipicamente AI, alógama

<i>S. arcanum</i> Peralta (quatro raças geográficas: 'humifusum', lomas, Marañon, Chotano-Yamaluc).	Desmembrada de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller	Verde com listras verdes escuras	Tipicamente AI, alógama, raramente AC, autógama, alógama facultativa
<i>S. chmeilewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>L. chmeilewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	Verde com listras verdes escuras	AC, alógama facultativa
<i>S. neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>L. parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	Verde com listras verdes escuras	AC, altamente autógama
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller	Vermelho	AC, autógama, alógama facultativa
<i>S. lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> Miller	Vermelho	AC, autógama, alógama facultativa
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>L. cheesmaniae</i> L. Riley	Amarelo, alaranjado	AC, exclusivamente autógama
<i>S. galapagense</i> S.C. Darwin & Peralta	Desmembrada de <i>L. cheesmaniae</i> L. Riley	Amarelo, alaranjado	AC, exclusivamente autógama

*AI = Autoincompatível; AC = Autocompatível

1.2. Características botânicas do tomateiro

O tomateiro é uma planta semi-perene, de porte arbustivo, sendo cultivada como planta anual. O hábito de crescimento da planta pode ser classificado em três grandes tipos: rasteira, semi-ereta ou ereta. O padrão de crescimento da planta do tomateiro é limitado nas variedades de crescimento determinado e virtualmente ilimitado nas cultivares de crescimento indeterminado, podendo neste caso, chegar a 10 m/ano de crescimento do ramo principal (Alvarenga, 2004). As diferentes características de arquitetura da planta, hábito de

crescimento e do tipo de fruto condicionam a aptidão da cultura, se para processamento industrial ou para o consumo fresco (*in natura*). O porte indeterminado é observado na maioria de variedades destinadas à produção de frutos para mesa, cujas plantas são tutoradas e podadas, com o caule podendo atingir mais de 2,5 m de altura. O porte determinado é comum em variedades adaptadas especialmente para cultura rasteira, com finalidade agroindustrial e suas hastes atingem cerca de um metro (Filgueira, 2003). Em temperaturas diurnas de 18°C a 25°C e noturnas de 13°C a 24°C, observa-se o melhor desempenho produtivo das plantas. O número de flores e o pegamento do fruto são intimamente influenciados por temperatura abaixo ou acima dos limites indicados para seu cultivo, prejudicando a firmeza e a cor dos frutos, que permanecem amarelados devido à inibição da síntese de licopeno e outros pigmentos de coloração avermelhada (Santos, 2009).

1.3. Consumo e valor nutricional do tomate e seus produtos

Diversas linhas de evidência apontam para o fato de que o consumo de frutas e hortaliças (incluindo o tomate) auxilia na prevenção de doenças e distúrbios metabólicos humanos tais como obesidade, diabetes, problemas cardiovasculares, hipertensão, osteoporose e câncer. O fruto do tomateiro apresenta baixos teores de gordura, baixos valores calóricos e relativamente pouca proteína. Por outro lado, são ricas fontes de carboidratos e fibras e fornecem níveis significativos de micronutrientes minerais à dieta. Além disso, os frutos do tomateiro possuem compostos funcionais, que beneficiam uma ou mais funções orgânicas, além da nutrição básica, contribuindo para melhorar o estado de saúde e bem-estar e/ou reduzir o risco de doenças. O princípio bioativo ácido fenólico aumenta a atividade enzimática, favorecendo a absorção de nutrientes e inibe substâncias cancerígenas; o beta-caroteno auxilia na prevenção à deficiência de vitamina A, previne mutações celulares e oxidação do colesterol LDL, implicada no desenvolvimento de câncer e doenças coronárias e

o licopeno pode proteger contra o câncer de próstata (Carvalho *et al.*, 2006). O fruto do tomateiro possui em sua composição de 93% a 95% de água. Nos 5% a 7% restantes, encontram-se compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em álcool e outros compostos (Embrapa, 2006).

Um dos principais fatores para a expansão da cultura do tomateiro no Brasil tem sido o incremento da renda e o seu impacto no crescimento do consumo. Entre 1983/1985 e 2003/2005, a produção mundial *per capita* de tomate cresceu 36%, passando de 14 kg por pessoa por ano para 19 kg (Carvalho & Pagliuca, 2007). A Turquia é o país que possui maior consumo per capita de tomate 85,7 Kg/hab/ano, seguido pelo Egito 84,4 Kg/hab/ano, o Brasil é o sétimo maior consumidor 18,5 Kg/hab/ano (FAOSTAT, 2011).

1.4. Dados econômicos do cultivo do tomateiro no Brasil

No Brasil aproximadamente 65,7 mil hectares são destinados à tomaticultura, sendo que nessa área são produzidos anualmente 4,2 milhões de toneladas de frutos. Cerca de 65% do total produzido é destinado ao consumo *in natura* e 35% para o processamento industrial (IBGE, 2010). A distribuição geográfica da produção de tomate por região, para os dois segmentos, apresenta o seguinte cenário: Sudeste 21.627 ha; Centro-Oeste 18.575 ha; Nordeste 13.246 ha; Sul 10.874 ha e Norte 558 ha. Os principais Estados produtores (englobando os dois segmentos) são Goiás; São Paulo; Minas Gerais; Bahia e Paraná (IBGE, 2012). Houve uma queda de 2% na área plantada de 2011 (66.221 ha) para 2012 (64.880 ha) e uma queda de 1.3% na produção (IBGE, 2012). No ranking da Produção Mundial de Tomate de 2010, o Brasil ocupa o 9º lugar; sendo a China a maior produtora, seguida dos Estados Unidos e da Índia (FAOSTAT, 2010). Em 25 anos a produção mundial cresceu 123%: em 1985 a média de produção era de 65,4 milhões/toneladas, já em 2010, este número saltou para 145,7 milhões/toneladas. O custo de produção de tomate é um dos maiores em toda atividade

agrícola. Para o tomate de mesa o custo da produção no país, em 2011, era de R\$ 47.730 mil/ha. No período de 2001 a 2011 o custo subiu 140%, mas houve incremento de 82% em produtividade no mesmo período (Rodrigues, 2012). De modo geral, o custo de produção apresenta grande variabilidade, ficando entre R\$ 30 mil e R\$ 55 mil por cada hectare plantado, dependendo da tecnologia empregada na produção e os níveis de produtividade que se espera obter na cultura. Já a rentabilidade depende fortemente da flutuação de preço que esse cultivo tem no mercado, o que está, muitas vezes, associada à lei da oferta e demanda, além, naturalmente, da qualidade do fruto (Abcsem, 2010).

No Brasil, a cultura do tomateiro para consumo *in natura* tem sido uma importante fonte de renda e ocupação de mão de obra rural (seis empregos diretos por hectare/ano). O cultivo é, normalmente, conduzido em sistema estaqueado, gerando uma intensa demanda por mão de obra desde a fase de pré-plantio, tratos culturais, colheita, transporte, abastecimento e comercialização. Na safra 2008, foram colhidas 2,5 milhões de toneladas de tomate de mesa com rendimento de 54 t/ha (IBGE, 2010). O incremento em produtividade no período 1980-2008 foi em torno de 80%, atribuído, em boa parte, à adoção de híbridos e de novas tecnologias de produção e manejo da cultura. O incremento de áreas de cultivo com lavouras de médio e grande porte, sendo administradas com estrutura empresarial e tendo forte adoção de tecnologia também resultou em um impacto positivo na produtividade.

O Brasil dispõe de uma cadeia agroindustrial de tomate muito bem estruturada e competitiva (Melo *et. al.*, 2008; Vilela *et al.*, 2012). Embora passível de mecanização em todas as suas fases, a cultura do tomateiro industrial demanda ainda um expressivo contingente de mão de obra (em torno de cinco pessoas por hectare/ano). A produção brasileira de tomate industrial atingiu um recorde em 2010 com um total produzido de 1,8 milhão de toneladas e rendimento de 85 t/ha. O destaque nacional foi o Estado de Goiás (rendimento de 89,5 t/ha).

A presença da cultura do tomateiro em quase todas as regiões brasileiras e praticamente o ano todo, propicia condições favoráveis ao desenvolvimento de pragas e doenças tanto para lavouras destinadas ao consumo *in natura*, como para a indústria (Souza & Reis, 2003), destacando-se doenças causadas por vírus, transmitidos pela mosca-branca.

2. ESPÉCIES DE BEGOMOVÍRUS E AS BEGOMOVIROSES.

2.1. Aspectos gerais

As principais doenças do tomateiro são aquelas de origem viral e dentre estas se destacam as causadas por espécies de vírus dos gêneros *Tospovirus* e *Begomovirus* (Kurozawa & Pavan 2005). No entanto, o tomateiro é também afetado por espécies pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* e mais recentemente por espécies do gênero *Crinivirus* (Barbosa *et al.*, 2010).

Os *Begomovirus* (192 espécies) estão classificados na família *Geminiviridae*, que possui outros seis gêneros *Mastrevirus* (29 espécies), *Curtovirus* (3 espécies), *Topocuvirus* (1 espécie), *Becurtovirus* (2 espécies), *Eragrovirus* (1 espécie) e *Turncurtovirus* (1 espécie) (ICTV, 2012) divididos de acordo com a gama de hospedeiros, inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (Fauquet *et al.* 2008, Fauquet & Stanley, 2005). A família *Geminiviridae* é caracterizada estruturalmente pela morfologia geminada da partícula viral, com aproximadamente 18-30 nm e de acordo com estrutura genômica por possuir uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular de fita simples (ssDNA). Cada uma das moléculas apresenta aproximadamente 2500-3000 nucleotídeos encapsidados por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos que confere o aspecto geminado das partículas virais, característico desta família de vírus de plantas (Lazarowitz, 1992). O gênero *Begomovirus* inclui os

geminivirus que podem possuir genoma tanto monopartido quanto bipartido, são transmitidos por biótipos de mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genn.) e infectam um amplo ciclo de plantas dicotiledôneas tanto no “velho” quanto no “novo mundo” (Rojas *et al.*, 2005). Entre os membros mais comumente estudados que apresentam genoma bipartido estão o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero (Fauquet *et al.*, 2000), *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Squash leaf curl virus* (SLCV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), uma das espécies predominantes no Brasil (Fernandes, 2010; Macêdo, 2011). Segundo Gutierrez (2002), entre os monopartidos destaca-se a espécie *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), ainda não encontrada no Brasil (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Fernandes, 2010). Na América Central, após a introdução do TYLCV este vírus tornou-se predominante em relação às espécies bipartidas, sendo responsável por imensas perdas econômicas (Maxwell, 2002).

A maioria das espécies de *Begomovirus* é restrita ao tecido floemático da planta e são transmitidos naturalmente por insetos vetores (Stanley, 2005). Nos *Begomovirus* bipartidos frequentemente os dois elementos genômicos são essenciais para o sucesso da infecção viral (Sunter & Bisaro, 1992). O DNA-A possui cinco ORFs, quatro no sentido complementar (Rep, Trap, REN e a AC4) e uma no sentido Viral (CP). O DNA-B possui duas ORFs, uma no sentido viral (NSP) e a outra no sentido complementar (MP) (Stanley, 2005). O DNA-A codifica proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA viral (Rep, TrAP, REN) e a capa protéica (CP) e o DNA-B é fundamental para o movimento célula a célula (MP) via plasmodesmata e para o movimento intracelular do núcleo para o citoplasma e vice-versa (NSP) (Rojas *et al.*, 2005) (Figura 1).

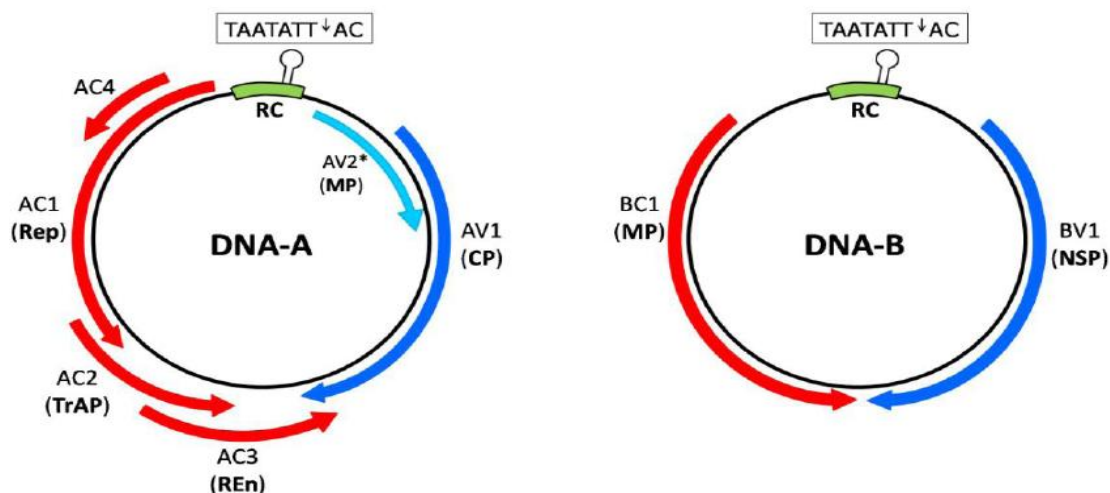


Figura 1- Representação esquemática do genoma de um begomovírus de genoma bipartido. Os círculos representam o genoma viral, dividido em dois componentes, DNA-A e DNA-B. Cada seta representa a região genômica contendo o gene completo. A transcrição é bidirecional nos dois componentes. As setas azuis são as ORFs com transcrição no sentido viral e as setas vermelhas indicam as ORFs com transcrição no sentido complementar. A sequência dentro da RC (região comum – cor verde) é conservada para todos os membros da família *Geminiviridae*. Dentro da RC localiza-se um “stem-loop motif” com sequência altamente conservada de nove nucleotídeos (5'-TAATATT↓AC-3'), contendo o sítio que é clivado (representado pelo símbolo ↓) pela proteína Rep para iniciar a replicação do DNA. A seta azul clara (sentido viral) é a AV2* que é uma ORF presente apenas em espécies de *Begomovirus* de genoma monopartido (Fernandes, 2010).

2.2. Estratégias gerais de controle e resistência genética aos begomovírus

O controle eficiente dos begomovírus preconiza a utilização simultânea de várias medidas/estratégias: **(1)** utilizar híbridos/variedades com resistência/tolerância ao vírus, quando possível; **(2)** utilizar mudas saudáveis e de alta qualidade; **(3)** as mudas devem ser produzidas em telados com entrada/visitação restrita e com eficiente controle de insetos; **(4)** conduzir as plantas com nutrição adequada para crescerem fortes, vigorosas e saudáveis; **(5)** não realizar plantio escalonado (novos plantios ao lado de lavouras mais velhas); **(6)** os produtores de uma determinada região devem se organizar de modo a sincronizar as datas de plantio e a ordem em que as lavouras serão formadas; **(7)** obedecer à legislação vigente quanto à época

de plantio para cada região; **(8)** estabelecer os cultivos, preferencialmente, contra o vento para diminuir o transporte de insetos presentes em lavouras velhas para lavouras novas; **(9)** destruir os restos culturais imediatamente após o término da fase de colheita, não abandonando as lavouras ao final do ciclo; **(10)** roçar ao redor dos campos de produção para reduzir potenciais fontes externas de vírus, que podem ser tanto tomateiros voluntários, como plantas daninhas e silvestres; **(11)** evitar estabelecer os novos plantios próximos a culturas como soja, feijão e algodão, que são excelentes hospedeiras da mosca-branca; **(12)** estabelecer um programa de controle do inseto vetor, visando manter baixa a população de mosca-branca com o uso de inseticidas aplicados em dosagem, método, princípio ativo e frequência adequados, com especial atenção na fase de produção de mudas e logo após o estabelecimento do campo, para evitar a infecção precoce. O controle da mosca-branca deve ser realizado em todo o ciclo da cultura, para evitar o amadurecimento desuniforme e a isoporização da polpa, decorrente da ação de toxinas injetadas pelo inseto, ao se alimentar (Inoue-Nagata *et al.*, 2009).

Nenhuma estratégia de controle, quando utilizada isoladamente, tem demonstrado ser efetiva para as doenças causadas por geminivírus. O controle químico das moscas-brancas é prejudicado pela constante migração de grandes populações do inseto de lavouras mais velhas para as mais novas (Harrison, 1985). Além disso, recentemente tem sido relatada resistência da mosca-branca a inseticidas (Horowitz *et al.*, 2007), ressaltando a necessidade por buscas de estratégias de manejo alternativas e com maior eficiência, como melhoramento de cultivares de tomate para resistência ao vírus.

As principais estratégias de melhoramento têm sido à busca de fontes com amplo espectro de resistência e/ou a “piramidização” de diferentes genes de resistência em linhagens-elite. Enquanto as variedades de tomateiro domesticado (*S. lycopersicum*) são suscetíveis aos begomovírus, altos níveis de resistência foram encontrados em várias espécies de tomate selvagem, incluindo *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S.*

habrochaites e *S. cheesmaniae* (Ji *et al.*, 2007). Algumas dessas espécies têm sido estudadas de maneira intensa e um amplo conjunto de genes/loci de resistência foi caracterizado e/ou mapeado (**Tabela 2**).

Tabela 2. Loci/genes de resistência oriundos de espécies de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) que foram geneticamente caracterizados e/ou mapeados.

Locus/ Gene	Espécies	Acessos Resistentes	Cromossomo	Referência
<i>Ty-1</i>	<i>S. chilense</i>	LA-1969	06	(Zamir <i>et al.</i> , 1994)
<i>Ty-2</i>	<i>S. habrochaites</i>	B6013	11	(Hanson <i>et al.</i> , 2006)
<i>Ty-3</i>	<i>S. chilense</i>	LA-1932 e LA- 2779	06	(Ji <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ty-4</i>	<i>S. chilense</i>	LA-1932	03	(Ji <i>et al.</i> , 2009)
<i>Ty-5</i>	<i>S. peruvianum</i>	TY-172*	04	(Anbinder <i>et al.</i> , 2009)
<i>ty-5</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Tyking	04	(Hutton <i>et al.</i> , 2012)
<i>tcm-1</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Tx-468 RG (linhagem derivada de Tyking)	06	(Giordano <i>et al.</i> , 2005b; Garcia-Cano <i>et al.</i> , 2008; Dissertação Mariana Machado, 2013)
<i>tgr-1</i>	<i>S. lycopersicum</i>	Linhagem derivada de Tyking	04 e 06	(Kardivel <i>et al.</i> , 2013)

O locus *Ty-1* se mostrou efetivo contra diferentes isolados de diferentes espécies de *Begomovirus* em vários continentes (Zamir *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 2005a; Boiteux *et al.*, 2007a). O locus *Ty-2* vem se mostrando com boa eficiência contra isolados brasileiros (Boiteux *et al.*, 2007b). O gene/locus *Ty-3* confere alto nível de resistência a TYLCV e resistência intermediária a isolados de espécies de genoma bipartido na Flórida (Ji *et al.*, 2007). O gene recessivo *tcm-1* (derivado de *S. lycopersicum* ‘Tyking’) tem se mostrado efetivo contra begomovírus de genoma bipartido do Brasil (Giordano *et al.*, 2005b) e

monopartido da Europa (García-Cano *et al.*, 2008). ‘FLA653’ é a linhagem fonte do gene recessivo *tgr-1* que deriva de cruzamentos múltiplos envolvendo *S. chilense* ‘LA-2779’ e ‘Tyking’ (Boiteux *et al.*, 2012). Mais recentemente, um gene de resistência também de natureza recessiva foi caracterizado (em distintas linhagens derivadas de ‘Tyking’) conferindo resistência a isolados de TYLCV na Florida. Esse gene (localizado no cromossomo 4) foi nomeado como *ty-5* (Hutton *et al.*, 2012).

3. O vetor *Bemisia tabaci*

O primeiro registro de mosca-branca (Hemiptera: Aleyrodidae) da espécie *Bemisia tabaci* (Gennadius) ocorreu na Grécia, em 1889, em plantas de fumo. No Brasil, até a década de 1980, praticamente se detectava somente a mosca-branca conhecida como *B. tabaci*, hoje denominada *B. tabaci* biótipo A, sendo que a ocorrência de begomovírus com importância econômica era restrita ao mosaico dourado do feijoeiro. Contudo com a introdução de *B. tabaci* biótipo B, na década de 1990, houve a sua rápida disseminação no país. Ao contrário do já existente biótipo A, o qual normalmente não colonizava o tomate, o biótipo B mostrou-se extremamente adaptado a esse hospedeiro (Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996).

Pesquisas recentes demonstraram que existe um complexo de biótipos, denominado complexo *B. tabaci* (De Barro *et al.*, 2011). Mundialmente, estima-se que exista mais de 20 biótipos, cada um com um comportamento diferenciado (Brown *et al.*, 1995). Dentre esses biótipos existe um, biótipo Q, que ainda não ocorre no Brasil, que deve ser motivo de preocupação devido à similaridade com o biótipo B e ao fato de ser resistente a maioria dos inseticidas. O biótipo Q é um vetor extremamente eficiente de espécies do complexo do *Tomato yellow leaf curl virus*, que caso seja introduzido, pode causar danos severos à tomaticultura nacional (Villas Bôas *et al.*, 2009).

As moscas brancas podem causar danos diretos, sugando a seiva do floema das plantas

hospedeiras, provocando alterações no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta e também podem causar danos indiretos, sendo a transmissão de vírus o dano mais sério (Byrne & Bellows Jr, 1991). Além disso, esses insetos excretam substâncias açucaradas que cobrem as folhas das plantas e servem de substrato para fungos, resultando na formação de fumagina, reduzindo o processo de fotossíntese e o valor comercial dos frutos (Villas Bôas *et al.*, 2002). Os adultos apresentam cor amarelo claro e asas brancas. Medem de 1 a 2 mm, sendo a fêmea maior que o macho. Quando em repouso, as asas são mantidas levemente separadas, com os lados paralelos, deixando o abdômen visível. Cada fêmea pode depositar de 130 a 300 ovos em média, durante o seu ciclo de vida (Silva, 2006). Posturas elevadas foram relacionadas com população exposta a doses elevadas de inseticidas, uma vez que em condições de alto estresse as fêmeas produzem mais ovos e mais fêmeas em sua prole (Dittrich *et al.*, 1990). A longevidade do inseto depende da alimentação e da temperatura.

A transmissão de begomovírus por *B. tabaci* é do tipo circulativa, de maneira que o vírus, após circular pelo corpo do inseto, antinge as glândulas salivares para ser, então, inoculado durante o processo de alimentação. O período mínimo de acesso de aquisição (PAA) varia de 10 a 60 minutos e o período de acesso de inoculação (PAI) varia de 10 a 30 minutos (Idris & Brown, 1998). O período de latência após a aquisição é de 17-20 horas e uma mosca adulta permanece virulífera de 7-20 dias (Mehta *et al.*, 1994).

4. VARIABILIDADE GENÉTICA DOS BEGOMOVÍRUS

Os geminivírus são considerados um grupo emergente de vírus de plantas, devido à alta incidência e severidade das doenças causadas por eles nas últimas décadas (Briddon *et al.*, 2003; Navas-Castillo *et al.*, 2011). A variabilidade genética em geminivírus ocorre por meio de mutação, recombinação e pseudo-recombinação (Monci *et al.*, 2002). A geração de

diversidade genética em populações pode refletir em uma maior adaptação a novas hospedeiras e condições ambientais.

Mutações são diferentes tipos de mudanças que ocorrem nos genes resultando em modificações hereditárias com perda, ganho ou mesmo com inalteração (mutação silenciosa) de uma característica fenotípica (Fernandes, 2010). As mutações ocorrem com maior frequência em genomas constituídos de RNA, devido a falhas da RNA polimerase em corrigir erros de leitura durante a replicação. Já em vírus de DNA, como os begomovírus a atividade da DNA polimerase resulta em baixos níveis de mutações (Roossinck, 1997).

As constantes epidemias nas lavouras de tomateiro e outras hospedeiras (Faria & Zerbini, 2000) têm sido atribuídas, em grande parte, com resultado de eventos de recombinação genética (considerada o principal mecanismo de variabilidade nos geminivírus). Recombinação genética é a troca de um segmento de material genético entre dois cromossomos virais em locais onde existe grande homologia. Como resultado, a progênie é diferente dos dois vírus parentais. Essa característica confere a esse grupo de vírus uma maior capacidade de evolução e adaptação a novos hospedeiros (Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999). O conjunto diversificado de begomovirose que ataca o tomateiro e a possibilidade de coinfeção aumentam as possibilidades de ocorrer recombinação entre diferentes espécies/variantes de begomovírus e contribuir para a emergência de novos isolados com diferentes atributos biológicos (Inoue-Nagata *et al.*, 2006). A função primária da recombinação pode ser a de reparar ssDNA defectivos que são originados através de mutações, resultando em recombinantes que podem, subsequentemente, sozinhos vir a ser prevalentes em populações onde a recombinação resultou em vantagem adaptativa (Seal *et al.*, 2006).

A presença de dois componentes genômicos em alguns begomovírus possibilita um mecanismo de variabilidade alternativo chamado de pseudo-recombinação (“reassortment”),

onde ocorre a combinação de genomas DNA-A e DNA-B intactos de vírus distintos em uma mesma célula hospedeira (Stanley *et al.*, 1985). Embora apresentando organização genômica similar, as diferentes espécies de begomovirus conseguem produzir pseudo-recombinantes viáveis somente quando ocorre uma interação altamente específica da proteína Rep com a região em torno da origem de replicação (Fontes *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 2006; Bull *et al.*, 2007). A conservação da sequência dos interons (Arguello-Astorga *et al.*, 1994) e a conservação estrutural dos aminoácidos da proteína Rep envolvidos no pareamento com os interons são os fatores primordiais para garantir a viabilidade dos pseudo-recombinantes (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). Os interons são duas sequências repetidas (em tandem) localizadas próximas da origem de replicação. Estes elementos são fundamentais, pois representam sítios de ligação vírus-específicos para a Rep correspondente iniciar o processo de replicação viral. Da mesma forma, os produtos dos genes codificados pelo componente DNA-B (MP e NS) devem ser capazes de mediar o movimento do DNA-A heterólogo, e esta habilidade parece ser dependente da origem geográfica (Novo ou Velho Mundo) dos vírus (Frischmuth *et al.*, 2000). A viabilidade de pseudo-recombinantes indica que fatores envolvidos na replicação e movimento são intercambiáveis entre espécies altamente relacionadas, ou entre estirpes de uma mesma espécie. Por outro lado, a assimetria entre pseudo-recombinantes recíprocos indica que a pseudo-recombinação entre begomovírus é um fenômeno complexo que envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro (Hill *et al.*, 1998). Alguns monopartidos também são capazes de adquirir permanentemente o DNA-B sob algumas condições de campo mudando para um vírus bipartido. Estes vírus têm sido denominados como mono-bipartidos (Sauders *et al.*, 2002).

5. MARCADORES GENÉTICOS

Marcadores genéticos são caracteres com mecanismo de herança simples que podem ser empregados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos. Estes marcadores podem ser divididos em dois grupos básicos, marcadores morfológicos e marcadores moleculares (Bered *et al.*,1997). Entre suas propriedades um marcador genético deve ser capaz de diferenciar os progenitores e deve ser reproduzido com precisão na progênie. Do ponto de vista molecular, um marcador genético (ou locus marcador) serve para identificar um local ou uma região de um cromossomo. Um marcador genético ideal deve apresentar uma série de atributos como alto nível de polimorfismo, estabilidade em diferentes ambientes e herança simples.

5.1. Marcadores morfológicos

Marcadores morfológicos são aqueles baseados na análise direta e simples de diferenças (polimorfismos) no fenótipo (morfologia) entre indivíduos. Esses marcadores têm sido utilizados para identificação de genótipos desde os tempos de Mendel. Os primeiros mapas genéticos eram fundamentados exclusivamente em marcadores morfológicos e citológicos. Estes se originaram de estoques cromossômicos com aberrações (como aneuploidias, translocações, inserções/deleções e inversões), principalmente nas culturas do milho, tomate e ervilha (Coe *et al.*, 1988). Entretanto seu uso apresenta muitas limitações em programas de melhoramento devido ao pequeno número de marcadores morfológicos em uma mesma linhagem, dificultando assim, as chances de se encontrar associações significativas entre estes marcadores e os genes de importância econômica que se deseja monitorar. Marcadores morfológicos apresentam a desvantagem de serem somente identificados em sua maioria, ao nível de planta inteira ou adulta. Por outro lado, marcadores bioquímicos ou fragmentos de DNA, podem ser utilizados a partir de amostras de células ou de tecidos de partes da planta

(folhas, embriões, cotilédones, pólen, sementes etc.) e também em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Dantas & Nodari, 2012).

5.2. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são obtidos via técnicas de detecção de polimorfismos em proteínas e/ou DNA e RNA, constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas e cuja presença/ausência pode caracterizar um determinado organismo (Gostimsky *et al.*, 1999). A tecnologia de marcadores moleculares viabiliza a caracterização genética de grande número de genótipos através de procedimentos relativamente simples e rápidos. Como consequência, a seleção de genitores superiores em programas de melhoramento é realizada de forma mais precisa, determinando a formação de populações segregantes com alta frequência de genótipos superiores (Bered *et al.*, 1997). Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em grandes dois grupos: derivados de hibridização ou amplificação de DNA. Dentre os identificados via hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*).

Outro tipo de marcador molecular (ou bioquímico) são as isoenzimas, estas constituem de diferentes formas moleculares (variantes) de uma mesma enzima, apresentando função idêntica ou similar, presente num mesmo indivíduo (Markert & Moller, 1959). Para maior entendimento os marcadores moleculares serão separados em dois grandes grupos: marcadores bioquímicos (isoenzimas) e marcadores de DNA (baseados em hibridação e baseados em amplificação / PCR).

5.2.1. Marcadores bioquímicos

5.2.1.1. Isoenzimas

Isoenzima é um termo geral que se refere às diferentes formas bioquímicas de uma enzima, as quais podem ser identificadas por migração e coloração em gel (Pinto *et al.*, 2001). Marcadores isoenzimáticos são produtos da expressão de genes, sendo identificados através de enzimas específicas visando uma reação específica que permita distinguir definidas enzimas de demais componentes do gel, em especial diante de quaisquer outras proteínas. Estes marcadores proporcionam ao pesquisador grande facilidade, pois a obtenção de produtos é evidenciada pela simples observação do gel (Brune *et al.*, 1998). São marcadores de tipo codominante, possibilitando identificação de todos os alelos para um mesmo gene (Malone *et al.*, 2007). A técnica de isoenzimas é de baixo custo, fácil, rápida, consistindo de três etapas: extração das enzimas do tecido vegetal, separação por eletroforese e coloração por métodos histoquímicos. Seu uso tem contribuído muito para caracterização de cultivares na soja (Anti, 2000), arroz (Bonow *et al.*, 2001), batata-doce (Oliveira *et al.*, 2002), batata (Rocha *et al.*, 2001), bananeira (Ulisses *et al.*, 2002) entre outras. Em tomateiro o locus 1 da fosfatase ácida (*Aps-1*) foi a primeira isoenzima empregada como marcador para o gene *Mi*, que confere resistência aos nematóides das galhas. Através do sequenciamento desse locus, foi possível desenvolver um marcador baseado em reações PCR (Williamson & Colwell, 1991). As principais desvantagens são o baixo número dos sistemas enzimáticos polimórficos e a influência das condições ambientais e dos tecidos vegetais nas atividades enzimáticas (May, 1992; Alfenas, 1998).

5.2.2. Marcadores de DNA

5.2.2.1. Marcadores baseados em enzimas de restrição e hibridação de sequências de DNA

5.2.2.1.1. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

As variações nos nucleotídeos do DNA devido à mutação, inserção/deleção e inversão podem ser detectadas se essas ocorrerem em uma região do genoma que define um sítio de corte de enzimas de restrição. Se o DNA de plantas diferindo em um ou vários desses nucleotídeos forem expostos a essas enzimas, diferentes padrões de fragmentos ou fragmentos de diferentes tamanhos, portanto polimórficos, são gerados e podem ser identificados e clonados. Tais fragmentos são denominados RFLPs e foram inicialmente desenvolvidos por Botstein *et al.* (1980). Os RFLPs são loci no DNA que podem ser identificados e mapeados. Os RFLPs têm permitido uma cobertura adequada do genoma, proporcionando a construção de densos mapas genéticos de ligação, que possibilitam a realização de análises genéticas e moleculares e várias aplicações no melhoramento de plantas, como clonagem de genes e mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (Nodari *et al.*, 1992). QTLs são regiões do genoma responsáveis pela expressão de caracteres fenotípicos quantitativos, que possuem distribuição contínua, tais como, altura e peso de plantas e de animais; produção de grãos; teor de óleo etc.

O elevado custo e o tempo necessário na geração de marcadores RFLPs restringem drasticamente seu uso de forma frequente. As etapas envolvendo a obtenção destes marcadores são as seguintes:

- Extração e purificação do DNA, que deve ser digerido por enzimas de restrição capazes de reconhecer uma pequena sequência de pares de bases (pb) e então cortar o DNA

neste sítio de reconhecimento;

- Separação da mistura de fragmentos de diferentes comprimentos pela eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos de DNA na condição de fita simples (após tratamento com hidróxido de sódio) são transferidos para uma membrana de nylon ou celulose carregada positivamente (*Southern blot*);

- Hibridação dos fragmentos de DNA imobilizados em membranas com uma sonda radioativa de DNA complementar ao fragmento de interesse;

- Autoradiografia: etapa que consiste na exposição da membrana hibridizada com a sonda radioativa a um filme de Raio X, que é revelado somente onde houve as hibridizações. A associação enzima de restrição e sonda identifica um locus RFLP, que apresenta uma típica herança mendeliana.

5.2.2.1.2. Minissatélites

Minissatélites são unidades de 10 a 100 pb repetidas em tandem, flanqueadas por sítios conservados de endonucleases de restrição. Também são conhecidos por VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Jeffreys *et al.*, 1985). Originalmente, esta metodologia utiliza os mesmos princípios da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que abrange técnicas de restrição do DNA e uso de sondas para hibridização, sendo extremamente laboriosa. Contudo, esses marcadores podem ser analisados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), de forma mais rápida e prática, uma vez que, as repetições são conservadas no genoma de uma mesma espécie. Muitos dos minissatélites são altamente polimórficos, produzindo um grande número de bandas. Por estarem espalhadas por todo o genoma e apresentarem um número variável de repetições em diferentes indivíduos em relação a uma mesma região cromossômica (locus), os minissatélites simultaneamente proporcionam um conjunto de marcadores genéticos que se constitui no que tem sido denominado de impressões

digitais de DNA, conseqüentemente, indivíduo-específicos. Para a obtenção do padrão de bandas utiliza-se o mesmo procedimento utilizado para o RFLP, com exceção de que a sonda contém repetições de sequência conhecida. As desvantagens são relacionadas à dominância dos marcadores e ao fato de a técnica ser mais trabalhosa, demorada e cara (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

5.2.2.2. Marcadores baseados em PCR

5.2.2.2.1. RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

Na década de 1980, foi desenvolvido um novo tipo de marcador molecular denominado de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* ou DNA polimórfico amplificado ao acaso) (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). O sistema RAPD faz parte da primeira geração de marcadores obtidos pela utilização de estratégias mais simples via PCR. É baseado na utilização de *primers* mais curtos (5-10 pb), onde utiliza-se tipicamente apenas um tipo de *primer* em cada reação, e de sequências arbitrárias, capazes de anelar ao acaso em diferentes regiões do DNA, em estudo, permitindo a obtenção de amplicons de tamanhos entre 50 e 2000 pb (Welsh & McClelland, 1990; Caetano-Anóles *et al.*, 1991). A baixa reprodutibilidade dos marcadores RAPD é uma questão bastante discutida. Na verdade, a técnica requer certa experiência com procedimentos moleculares, cuidado com o preparo das reações e rigor na leitura e análise dos fragmentos visualizados no gel. A quantidade e qualidade do DNA, a concentração de íons magnésio e da enzima *Taq* polimerase são alguns dos aspectos que devem ser considerados nos ensaios de RAPD. É importante que o DNA esteja padronizado e não muito concentrado, livre de contaminações de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos, pois estas substâncias inibem ou diminuem a ação da *Taq* polimerase (Lopes *et al.*, 2012).

Em plantas, os RAPDs têm facilitado a condução de estudos em genética e melhoramento, até então, considerados inexequíveis com as técnicas tradicionais. Uma diferença entre o DNA de duas plantas que ocorra na região de anelamento do *primer* é identificada pela ausência da referida banda em uma delas e presença da banda na outra. No caso de indivíduos heterozigotos, estes produzem as mesmas bandas que os homozigotos, pois os marcadores RAPDs são dominantes. As principais vantagens da técnica são a facilidade e a rapidez para obtenção dos marcadores, a necessidade de quantidades mínimas de DNA e a universalização das análises (Faleiro, 2007).

5.2.2.2. SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*)

Para diminuir os problemas associados com a instabilidade do perfil de amplicons do sistema RAPD, *primers* específicos (15-30pb) podem ser desenhados a partir do sequenciamento de determinado amplicon RAPD ligado a uma característica de interesse, de modo a produzir marcadores do tipo SCAR (Paran & Michelmore, 1993; Corrêa *et al.*, 2000). As etapas principais no desenvolvimento de um SCAR são: **(1)** identificação de um iniciador que confere polimorfismo a dois bulks de DNA com fenótipos contrastantes; **(2)** o isolamento e a clonagem do fragmento amplificado em um vetor (plasmídeo); **(3)** sequenciamento do fragmento isolado; **(4)** desenho dos iniciadores de tamanho maior que os decâmeros e **(5)** o teste ou validação final (Paran & Michelmore, 1993). Até a etapa **3** usa-se de marcadores RAPDs. De posse da seqüência, se desenharam os *primers*/iniciadores (etapa **4**) com comprimento variável entre 16 e 24 pares de bases. A idéia de um iniciador mais comprido surgiu de cálculos feitos sobre o comprimento mínimo para a estabilidade de um *primer* amplificar uma seqüência única de um genoma vegetal. Desta forma, espera-se a geração de uma banda única com o uso dos referidos iniciadores. Existem programas de computador que auxiliam a tomada de decisão para a escolha do *primer* mais adequado como, por exemplo o

PrimerSelect[®]. Esses aplicativos computacionais proporcionam valiosas informações comparativas a respeito de diferentes iniciadores que são gerados quando uma determinada sequência de bases é fornecida ao programa.

5.2.2.2.3. Microssatélites (*Simple Sequence Repeat*)

Os microssatélites são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em “tandem”, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os loci mais polimórficos dos genomas (Ferguson *et al.*, 1995; Milach, 1998; Matioli, 2001). Por exemplo, a sequência GACAGACAGACAGACA, também representada (GACA)₄, é um microssatélite. O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (Studart, 2001). Em genomas de eucariotos estas sequências estão distribuídas ao acaso e constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis, devido à sua alta taxa de mutação. Ao usar-se primers específicos que flanqueiam o microssatélite para sua amplificação, têm-se diferenças entre indivíduos de acordo com o número de repetições da sequência, ou seja, bandas de tamanhos diferentes serão produzidas.

Os microssatélites são marcadores codominantes e cobrem bem o genoma, entretanto, para o uso rotineiro existe a necessidade de primeiro amplificar uma região, posteriormente sequenciar e em terceiro lugar, sintetizar os iniciadores específicos para cada locus. Uma vez feito isto, o locus marcador pode ser utilizado indefinidamente naquela espécie. Desta forma, existe um custo elevado e trabalho no início, mas o custo subsequente é baixo e a simplicidade a posteriori, é muito grande.

5.2.2.2.4. AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Os marcadores gerados pela análise de polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), descrita por Vos *et al.* (1995), associam os polimorfismos gerados por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. Para obtenção de marcadores AFLP o primeiro passo é a digestão do DNA por duas enzimas de restrição: uma de corte raro e outra de corte frequente. É fundamental que a digestão do DNA seja completa, pois a digestão parcial pode revelar falsos polimorfismos. A técnica baseia-se na propriedade de certas enzimas de restrição de deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequência conhecida. Assim, é possível construir sequências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominadas de adaptadores. Uma vez conhecidas a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição, podem-se construir iniciadores específicos a essas sequências para pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Esta etapa consiste na amplificação dos fragmentos agora ligados aos adaptadores através da reação da polimerização em cadeia com o uso de iniciadores, complementares aos adaptadores com uma base a mais. A amplificação final é feita com uma pequena amostra da primeira amplificação. Neste caso são utilizados iniciadores que são compostos de todas as bases dos *primers* da primeira amplificação, mais duas a três bases, dependendo do nível de polimorfismo da espécie ou da população. Existem inúmeras vantagens no uso da técnica de AFLP, como alto número de bandas analisadas em um único gel, pela restrição e amplificação de fragmentos espalhados por todo o genoma, além da considerável estabilidade do perfil de amplicons e, principalmente, por não necessitar de dados de sequenciamento prévio da espécie em estudo (Spooner *et al.*, 2005).

5.2.2.2.5. CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*)

CAPS são fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se de primers específicos (20 a 30 pb), seguido da digestão com endonucleases de restrição (Williams *et al.*, 1990). As etapas para obtenção desses marcadores são a extração e amplificação de DNA via PCR, a digestão com enzimas de restrição, eletroforese em géis de agarose e a visualização dos polimorfismos pela coloração com brometo de etídeo sob luz ultravioleta. As principais vantagens são a codominância e a alta reprodutibilidade dos marcadores e a principal desvantagem é a necessidade de conhecimento prévio de sequência de DNA para a construção dos primers (Faleiro, 2007).

6. APLICAÇÕES DOS MARCADORES DE DNA NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Dois aspectos são fundamentais no planejamento de um programa de melhoramento genético: a seleção dos genitores e os mecanismos de herança dos caracteres a serem selecionados. Para a escolha dos genitores o conhecimento da variabilidade genética existente é decisivo (Barbosa Neto, 1995). Um marcador genético deve apresentar os seguintes atributos: alto nível de polimorfismo; estabilidade em diferentes ambientes e ser de herança simples (Milach, 1998; Matioli, 2001). Os marcadores moleculares ideais são aqueles denominados funcionais, ou seja, derivados dos próprios genes que conferem a característica de interesse. Diversos genes de resistência a doenças têm sido isolados, utilizando as estratégias de mapeamento genético/físico de alta resolução (*map-based cloning* ou *positional cloning*). Esse tipo de trabalho tem o objetivo de encontrar marcadores moleculares próximos/ligados ao gene de interesse, saturando a região onde o gene se localiza, com vários marcadores, o que vem sendo acelerado/facilitado em algumas espécies cujos genomas

completos já estão disponíveis.

Os mapas de ligação (*linkage maps*) são construídos com base em análises da segregação dos marcadores em uma população segregante, geralmente na geração F₂. Na construção destes mapas, quando marcadores polimórficos são encontrados, eles devem ser validados em toda a população de mapeamento, que é a genotipagem da população. Portanto, o DNA de cada indivíduo da população de mapeamento deve ser extraído. As taxas de segregação esperadas para marcadores dominantes e codominantes para uma população F₂ são, respectivamente, 3:1 (A_:aa) e 1:2:1 (AA:Aa:aa) (Collard *et al.*, 2005). Desvios significativos entre taxas esperadas e taxas observadas, podem ser analisados usando o teste qui-quadrado. Geralmente, os marcadores segregarão em um modelo Mendeliano, embora taxas de segregação distorcidas possam ser encontradas, especialmente em cruzamentos inter-específicos entre espécies cultivadas e selvagens (Sayed *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1997). A última etapa para a construção de um mapa de ligação envolve a análise dos dados obtidos de cada marcador de DNA de cada um dos indivíduos da população e a análise da ligação utilizando softwares com essa função, sendo os mais usados: Map-maker/EXP (Lander *et al.*, 1987; Lincon *et al.*, 1993), MapManager QTX (Manly *et al.*, 2001) e JoinMap (Stam, 1993). Algumas análises mais simples podem ser feitas de forma manual, dividindo o número de indivíduos recombinantes para os fatores analisados pelo total de indivíduos da população, contudo, para construir mapas com grande número de marcadores, é recomendado o uso de softwares.

A acurácia para medir a distância genética e determinar a ordem dos marcadores está diretamente relacionada com o tamanho da população de mapeamento. Populações ideais para construção de mapas de ligação são aquelas que possuem no mínimo 50 indivíduos (Young, 1994). A distância no mapa de ligação é medida em termos de frequência da recombinação entre marcadores genéticos (Paterson, 1996), essa distância é medida em centiMorgans (cM),

pois a frequência de recombinação e a frequência de *crossing-over* não são linearmente relacionadas (Hartl & Jones, 2001). Quanto maior a distância entre e dos marcadores com o fator estudado, maior a chance de ocorrer recombinação durante a meiose. Quando as distâncias mapeadas são pequenas (<10cM), a distância mapeada se iguala à frequência de recombinação. Entretanto, esta relação não se aplica a distâncias mapeadas maiores que 10 cM (Hartl & Jones, 2001).

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Eles podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subsequentes, comprovando sua natureza genética (Milach, 1998). De fato, a informação inicial sobre a estrutura dos genes de resistência a vírus permite agora o estabelecimento de métodos mais eficientes e/ou simplificados, baseados em homologia com genes análogos/homólogos (*homology-based methods*), ou a busca de genes candidatos (Tomita *et al.*, 2011). Os genes dominantes clonados e estruturalmente caracterizados se enquadram como típicos genes R (conhecidos como raça-específicos ou isolado-específicos) dentro do modelo de interação gene a gene. A maior classe de genes dominantes codifica proteínas com domínio do tipo *nucleotide-binding* (NB) e *leucine-rich repeat* (LRR), que reconhecem fatores de avirulência codificados pelo genoma viral. O reconhecimento e a especificidade são condicionados pelas regiões C-terminais dos domínios LRR. O domínio NB funciona como um acionador molecular que regula a ativação da cadeia de transdução de sinais que leva ao fenótipo resistente (Boiteux *et al.*, 2012).

A seleção assistida por marcadores consiste na identificação precoce de plantas que apresentam fenótipo desejável pela análise molecular de seu genótipo. Mohan *et al.* (1997) destacam três requisitos básicos para realização de seleção assistida por marcadores em

programas de melhoramento:

- (1) O marcador deve estar associado ao gene de interesse;
- (2) A técnica deve ser eficiente para a avaliação de grandes populações e baseada em PCR;
- (3) A técnica deve mostrar-se altamente reproduzível entre laboratórios, ser econômica e de fácil condução.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCSEM, 2010. Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças. [<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=284>] Consultado em 18/02/2013.
- ABDULLAHI I., ATIRI G. I., THOTTAPPILLY G., WINTER S. 2004. Discrimination of cassava-associated *Bemisia tabaci* in Africa from polyphagous populations, by PCR–RFLP of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. *J Appl Entomol* 128: 81–87.
- ALFENAS, A.C. 1998. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: Editora UFV. 574pp.
- ALVARENGA, M. A. R. 2004. Origem, Botânica e Descrição da Planta. In: Alvarenga, M. A. R.; Silva, A.C.; Bastos, A.R.R.; Zambolim, E.M.; Vale, F.X.R.; Carvalho, G.A.; Carvalho, J.G.; Zambolim, L.; Lima, A.L.; Furlani, P.R.; Souza, R.A.M.; Faquin, V. Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. 1ª ed. UFLA. Lavras. p.15–23.
- ANBINDER I, REUVENI M, AZARI R, PARAN I, NAHON S, SHLOMO H, CHEN L, LAPIDOT M, LEVIN I. 2009. Molecular dissection of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor Appl Genet* 119 (3): 519–530.
- ANDRADE, E.C.; MANHANI, G.G.; ALFENAS, P.F.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. 2006. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology* 87: 3687–3696.
- ANTI, A.B. 2000. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas da semente. *Bragantia* 59: 139–142.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; GUEVARA-GONZALES, R.G.; HERRERA-ESTRELLA, L.R.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203: 90–100.
- BARBOSA, J.C.; TEIXEIRA, L.D.D. & REZENDE, J.A.M. 2010. First Report on the susceptibility of sweet pepper crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Disease* 94: 374.
- BARBOSA NETO, J.F. 1995. Application of molecular markers to genetic diversity and quantitative trait loci detection studies in oat and wheat. Ithaca, NY. 87pp. Thesis (Plant Breeding) – Cornell University.
- BERED, F.; NETO, J.F.B.; CARVALHO, F.I.F. 1997. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural* 27 (3): 513–520.

- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; VIEIRA, J.V.; PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2012. Melhoramento para resistência a doenças virais. p. 89–119. In: Melhoramento de Planas para Condições de Estresses Bióticos. Borém A; Fritsch-Neto R (editores). Editora Suprema, Visconde de Rio Branco, MG. 240pp.
- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA V.R.; SILVA C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO L.B. 2007a. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. *Horticultura Brasileira* 25: 20–23.
- BOITEUX, L.S.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. 2007b. Reação de acessos de tomateiro portando o gene *Ty-2* (introgredido de *Solanum habrochaites* f. *glabratum*) a um isolado de begomovírus de genoma bipartido. *Horticultura Brasileira* 25: S97.
- BONOW, S.; AUGUSTIN, E.; FRANCO, D.F.; PETERS, J.A.; TERRES, A.L.S. 2001. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36 (2): 291–300.
- BOTSTEIN D; WHITE RL; SKOLNICK M; DAVIS RV. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314–331.
- BRIDDON R. W.; BULL S.E.; AMIN I.; IDRIS I.M.; MANSOOR S.; BEDFORD I.D.; DHAWAN P.; RISHI N.; SIWATCH S.S.; ABDEL-SALAM A.M.; BROWN J.K.; ZAFAR Y., MARKHAM P.G. 2003. Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* 312: 106–121.
- BROWN, J. K.; COATS, S. A.; BEDFORD, I. D.; MARKHAM, P. G.; BIRD, J.; FROHLICH, D. R. 1995. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemical Genetics*, 33 (7/8): 205–214.
- BRUNE, W.; ALFENAS, A.C.; JUNGHANS, T.G. 1998 Identificações específicas de enzimas em géis. In: Alfenas, A. C. (editor). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Universidade Federal de Viçosa: UFV, p. 201–328.
- BULL, S.E.; BRIDDON, R.W.; SSERUBOMBWE, W.S.; NGUGI, K.; MARKHAM, P.G. & STANLEY, J. 2007. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. *Journal of General Virology* 88: 1624–1633.
- BYRNE, D.N.; BELLOWS JR, T.S. 1991. Whitefly biology. *Annual Review of Entomology* 36: 431–457.
- CAETANO-ANOLLÉS G., BASSAM B.J., GRESSHOFF P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9: 553–556.
- CALVERT, L.A.; CUERVO, M.; ARROYAVE, J.A.; CONSTANTINO, L.M.; BELLOTTI, A.; FROHLICH, D. 2001. Morphological and mitochondrial DNA marker analyses of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) colonizing cassava and beans in Colombia. *Ann Entomol Soc Am* 94: 512–519.
- CARVALHO, J.L & PAGLIUCA, L.G. 2007. Tomate, um mercado que não pára de crescer globalmente. Hortifruti Brasil. http://www.dag.ufla.br/site/_adm/upload/file/Luciane%20Vilela%20Resende/tomate%20artigo.pdf . Consultado em 14/05/2012.
- CARVALHO, P.G.B.; MACHADO, C.M.M.; MORETTI, C.L.; FONSECA, M.E.N. 2006. Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticultura Brasileira* 24: 397–404.
- CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SIMÓN, B.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; BEITIA, F.; CENIS, J.L. 2000. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:

- Aleyrodidae) based on AFLP analysis. Bull Entomol Res 90: 391–396.
- COE, H.E.; NEUFFER, M.G.; HOISINGTON, D.A. The genetics of corn. 1988. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J.W. (Eds.). Corn and corn improvement, p.81-237.
- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142:169–196.
- CORRÊA, R.X.; COSTA, M.R.; GOOD-GOD, P.I.; RAGAGNIN, V.A.; FALEIRO, F.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. 2000. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. Crop Science 40: 804–807.
- DANTAS, A.C.M.; NODARI, R.O. 2012. Marcadores Genéticos. UFSC. <http://www.lfdgv.ufsc.br/MARCADORESMOLECULARES2.pdf>. Consultado em 30/10/2012.
- DITTRICH, V.; ERNST, G.H.; RUESCH, O.; SOLANG, U.K. 1990. Resistance mechanisms in sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Sudan, Turkey, Guatemala, and Nicaragua. Journal of Economic Entomology 83: 1665–1670.
- EMBRAPA HORTALIÇAS, 2006. Cultivo de tomate para industrialização/Composição nutricional.http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/composicao.htm. Consultado em 14/05/2012.
- FALEIRO, F.G. 2007. Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Embrapa Cerrados. Planaltina, DF, 102p.
- FAOSTAT – FAO. 2011. Statistics Division. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Consultado em 14/05/2012.
- FAOSTAT – FAO. 2010. Food and Agricultural commodities production. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consultado em 07/01/2013.
- FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROW, J.; MORIONES, E.; STANLEY, J. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Archives of Virology 153: 738–821.
- FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P.; GRONENBORN, B. & STANLEY, J. 2000. Revised proposal for naming geminiviruses. Archives of Virology. 145: 1743–1761.
- FAUQUET, C.M. & STANLEY, 2005. Revising the way we conceive and names viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. Archives of Virology 150:2151-2179.
- FARIA J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. 2000. Situação atual das geminiviruses no Brasil. Fitopatologia Brasileira 25, 125–137.
- FERGUSON, A.; TAGGART, J.B., PRODHOL, A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to Salmo. Journal of Fish Biology 47: 103–126.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220pp.
- FERNANDES, N.A.N. 2010. Variabilidade genômica e geográfica de espécies de begomovírus em tomateiro e em dois gêneros de plantas daninhas no Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 118 pp.
- FILGUEIRA, F.A.R. 2003. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2 ed. Viçosa, UFV, 412pp.
- FONTES, E.P.B.; EAGLE, P.A.; SIPE, P.S.; LUCKOW, V.A. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1994. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. Journal of Biological Chemistry 269: 8459–8465.
- FRANÇA, F.H., VILLAS-BOAS, G.L.; BRANCO, M.C. 1996. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. Annal of the Society of Entomology of Brazil 25: 396–372.

- FRISCHMUTH, T.; UNSELD, S.; RINGEL, M.; KONRAD, A.; LAUSTER, A. 2000. Virus-specific adaptations for production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. *Virology* 274: 179–188.
- GARCÍA-CANO, E.; RESENDE, R.O.; BOITEUX L.S.; GIORDANO L.B.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. 2008. Phenotypic expression, stability and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology* 98: 618–627.
- GIORDANO, L.B.; ARAGÃO, F.A.S.; BOITEUX, L.S. 2003. Melhoramento genético do tomateiro. *Informe Agropecuário* 24 (219): 43–57.
- GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; BOITEUX, L.S. 2005a. Efeito da infecção precoce de begomovírus com genoma bipartido em características de fruto de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* 23: 815–818.
- GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA F.M.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX L.S. 2005b. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. ‘Tyking’. *Euphytica* 143: 27–33.
- GORDILLO, L.F., STEVENS, M.R., MILLARD, M.A. & GEARY, B. 2008. Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease* 92: 694–704.
- GUTIERREZ, C. 2002 Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60: 219–230.
- HANSON, P; GREEN, SK; KUO, G. 2006. *Ty2*, a gene in chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genet Coop Rep* 56: 17–18.
- HARRISON, B.D., 1985 Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23: 55–82.
- HARTL, D. & E. JONES, 2001. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.
- HILL, J.E.; STRANDBERG, J.O.; HIEBERT, E. & LAZAROWITY, S.G. 1998. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of *Cabbage leaf curl virus*: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. *Virology* 250: 283–292.
- HOROWITZ, R.; DENHOLM, I.; MORIN, S. 2007. Resistance to insecticides in the TYLCV vector, *Bemisia tabaci*. In *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease* (Czosnek, H., ed). Netherlands: Springer, pp. 305–325.
- HUTTON, S.F.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2012. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as Ty-5 on chromosome 4. *HortScience* 47: 324–327.
- IBGE, 2012. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201202.pdf. Consultado em 24/02/13.
- IDRIS, A.M. & BROWN, J.K. 1998 *Sinaloa tomato leaf curl geminivirus*: Biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. *Phytopathology* 88: 648–657.
- INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C.; BÔAS, G.L.V. 2009. Os Geminivírus em Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. *Circular Técnica*, 71. ISSN1415-3033.
- INOUE-NAGATA, A.K.; MARTIN, D.P.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B.; BEZERRA, I.C.; ÁVILA, A.C. 2006. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting *Begomovirus* complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41 (8): 1329–1332.
- INOUE-NAGATA, A.K.; NAVAS-CASTILLO, J.; MELO, P.C.T.; ÁVILA, A.C. 2004. Busca por *Tomato yellow leaf curl virus* e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* em

- tomateiros. *Horticultura Brasileira* 22: 799–800.
- JEFFREY, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314: 67–73.
- JI, Y.; SCHUSTER, D.J.; SCOTT, J.W. 2007. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20: 271–284.
- JI, Y.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2009. Molecular mapping of *Ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of American Society for Horticultural Science* 134(2): 281–288.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A., 2005. Doenças do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), pp 607–626. In: Kimati, H.; Amorim, J; Rezende, J.A.M.; Filho, A.B.; Camargo, L.E.A. (editores). Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, São Paulo.
- KHASDAN, V.; LEVIN, I.; ROSNER, A.; MORIN, S.; KONTSEDALOV, S.; MASLENIN, L.; HOROWITZ, A. R. 2005. DNA markers for identifying biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and studying population dynamics. *Bull Entomol Res* 95: 605–613.
- LANDER, E.S.; GREEN P.; ABRAHAMSON J.; BARLOW A.; DALY M.J.; LINCOLN S.E.; NEWBURG, L. 1987. Mapmaker an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.
- LAZAROWITZ, S.G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 11: 327-349.
- LINCOLN, S.; DALY, M.; LANDER, E. 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Version 3.0. Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, 3rd Edn.
- LOPES, R.; GOMES LOPES, M.T.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. 2012. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 29: 56–60.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53: 53–59.
- MALONE, G.; ZIMMER P.D.; MENEGHELLO G.E.; CASTRO M.A.S.; PESKE, S.T. 2007. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. *Revista Brasileira de Sementes* 29 (1): 61–67.
- MANLY, K.F., CUDMORE JR., R.H.; MEER J.M. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12: 930–932.
- MARKERT, C.L.; MOLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes: issue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 45: 753–763.
- MATIOLI, S.R. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: Matioli S.R. (Ed.). *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 202pp.
- MAY, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes In: Hoelzel, A.R. (Ed.). *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford: Oxford University, p.1-27.
- MAXWELL, D. 2002. Molecular characterization of tomato-infecting Geminiviruses in Central America. Update on Dominican Republic story. *Hirt. and Crop Science Series* v.724, p.4.
- MEHTA, P., WYMAN, J.A., NAKHLA, M.K., MAXWELL, D.P. 1994. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87: 1291–1297.

- MELO, P.C.T.; BOITEUX, L.S.; VILELA, N.J.; FERRAZ, E. 2008. Tomate para Processamento Industrial. In: Albuquerque, A.C.S.; Silva, A.G. (Ed.). Desenvolvimento da agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília-DF: Embrapa. v. 1, p. 547–556.
- MILACH SCK. 1998. Marcadores de DNA. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento 5: 14–17.
- MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R.; SASAKI, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87–103.
- MONCI, F.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303: 317–326.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49: 219–248.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.; GEPTS, P. 1992. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based genetic linkage map. *Theoretical Applied Genetics* 85: 513–520.
- OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, M.A.N.; SEDIYAMA, T.; FINGER, F.L.; CRUZ, C.D. 2002. Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticas. *Horticultura Brasileira* 20: 576–582.
- PADIDAM, M., SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218–225.
- PARAN, I; MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical Applied Genetics*, 85: 985–993.
- PATERSON, A.H., 1996. Making genetic maps. In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, p. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.
- PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *TGC Report*, v.56, p.6-12. <http://tgc.ifas.ufl.edu/vol56/html/vol56featr.htm>. Consultado em 10/08/2012.
- PERALTA, I.E.W.; SPOONER, D.M. 2001. Granule-bound starch synthetase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill) Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* 88: 1888–1902.
- PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P.; SOUZA JUNIOR, C.L. 2001. Isoenzimas e microssatélites em plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 20: 16–19.
- RICK C.M.; LATERROT, H.; PHILOUZE, J. 1990. A revised key for the *Lycopersicon* species. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 40: 31.
- RICK, C.M. 1983. Tomato (*Lycopersicon*) p.147–165. In: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding – Part B*. Tanksley SD; Orton TJ (eds.), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- ROCHA, B.H.G.; AUGUSTIN, E.; SILVA, J.B.; VIÉGAS, J. 2001. Isoenzymatic variability in wild potatoes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36: 781–791.
- RODRIGUES, L.E. 2012. Tomaticultura: valioso seguimento do agronegócio nacional. ABCSEM. <http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=2420>. Consultado em: 14/05/2012.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. 2005 Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of*

- Phytopathology 43: 361–394.
- ROOSSINCK, M. J. 1997. Mechanisms of plant virus evolution. Annual Review of Phytopathology. 35: 191–209.
- SANTOS, F.F.B. 2009. Obtenção e seleção de híbridos de tomate visando à resistência ao *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). Dissertação Mestrado. Instituto Agrônomo. Campinas, SP.
- SAYED, H.; KAYYAL, H.; RAMSEY, L.; CECCARELLI, S.; BAUM, M. 2002. Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat markers. Euphytica 225: 265–272.
- SILVA, S.J.C. 2006. Detecção, caracterização molecular e diversidade genética de Begomovirus que infectam Fava (*Phaseolus lunatus* L.) Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas. Alagoas.
- SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. 2000. Tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças. 168pp.
- STAM, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. Plant Journal 3: 739–744.
- STANLEY, J.; TOWNSEND, R.; CURSON, S. J. 1985. Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolate of cassava latent virus. Journal General Virology 66: 1055–1061.
- STUDART. M.T. 2001. Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP. Dissertação Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.
- SAUNDERS, K., SALIM, N., MALI, V.R., MALATHI, V.G., BRIDDON, R., MARKHAM, P.G.; STANLEY, J. 2002. Characterization of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and *Indian cassava mosaic virus*: Evidence for aquisition of a DNA-B component by a monopartite begomovirus. Virology 293: 63–74.
- SEAL, S.E.; VANDERBOSCH, F.; JEGER, M.J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. Critical Reviews in Plant Science 25: 23–46.
- SOUZA, J.C.; REIS, P.R. 2003. Principais pragas do tomate para mesa: bioecologia, dano e controle. Informe Agropecuário 24: 79–92.
- SPOONER, D.M.; HETTERSCHEID, W.L.A.; VAN DEN BERG, R.G.; BRANDENBURG, W. 2003. Plant nomenclature and taxonomy: An horticultural and agronomic perspective. Horticultural Review 28: 1–60.
- SPOONER, D.; VAN TREUREN, R.; DE VICENTE, M.C. 2005. Molecular markers for genebank management. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. 126 pp. (IPGRI Technical Bulletin, 10).
- SUNTER, G.; BISARO, D.M., 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level transcription. The Plant Cell 4: 1321–1333.
- TOMITA, R.; SEKINE, K.T.; MIZUMOTO, H.; SAKAMOTO, M; MURAI, J.; KIBA, A.; HIKICHI, Y.; SUZUKI, K.; KOBAYASHI, K. 2011. Genetic basis for the hierarchical interaction between *Tobamovirus* spp. and *L* resistance gene alleles from different pepper species. Molecular Plant Microbe Interactions 24: 108–117.
- WARNOCK, S.J. 1988. A review of taxonomy and phylogeny of genus *Lycopersicon*. HortScience 23: 669–673.
- WEESE, T.L.; BOHS, L.A. 2007. Three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). Systematic Botany 32: 445–463.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers Nucleic Acids Res., 18:7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.1990.

- DNA polymorphism amplified by arbitrary primers re useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
- ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C.C.; MARTINS, L.S.S.; FREITAS, N.S.A. 2002. Caracterização isoenzimática de clones de bananeira nanica submetidos à salinidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 6: 358–361.
- VILELA, N.J.; MELO PCT; BOITEUX, L.S.; CLEMENTE, F.M.V.T. 2012. Perfil Socioeconômico da Cadeia Agroindustrial no Brasil. In: F.M.V.T. Clemente; L.S. Boiteux. (Org.). *Produção de Tomate para Processamento Industrial*. 1ª edição. Brasília-DF: Embrapa, v. 1, p. 17-27.
- VILLAS BÔAS, G.L.; BRANCO, M.C. 2009. Manejo Integrado da Mosca-Branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria (PITI). *Circular Técnica*, 70. ISSN 1415-3033.
- VILLAS BÔAS, G.L.; FRANÇA, F.H. & MACEDO, N. 2002 Potencial biótipo da mosca-branca *Bemisia argentiolii* a diferentes plantas hospedeiras. *Horticultura Brasileira* 20 (1): 71–79.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.
- XU, Y.; ZHU, L.; XIAO, J.; HUANG, N.; MCCOUCH, S.R. 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular General Genetics* 253: 535–545.
- YOUNG, N.D. 1994. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers, p. 39–57, In: I. K.V. Ronald & L. Phillips (Eds.), *DNA-based markers in plants*. Kluwer, Dordrecht/ Boston/London.
- ZAMIR, D., EKSTEIN MICHELSON, I., ZAKAY, Y., NAVOT, N., ZEIDAN, M., SARFATTI, M., ESHED, Y., HAREL, E., PLEBAN, T.; VAN OSS, H. 1994. Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 141–146.
- ZHOU, X., LIU, Y., CALVERT, L., MUNOZ, D., OTIM-NAPE, G.W., ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* 78: 2101–2111.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE DOSAGEM DA REGIÃO GENÔMICA CONTENDO O LOCUS *Ty-1* NA EXPRESSÃO DA RESISTÊNCIA AO *Tomato severe rugose virus* (GÊNERO *Begomovirus*) EM TOMATEIRO.

Daniela D.X. Ferro¹; Maria Esther N. Fonseca²; Antonio W. Moita² & Leonardo S. Boiteux^{1,2}

¹Universidade de Brasília (UnB), Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Biologia, 70910-900 Brasília (DF), Brasil;

²Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Hortaliças), CP 218, 70359-970 Brasília-DF, Brasil.

RESUMO

Efeito de dosagem da região genômica contendo o locus *Ty-1* na expressão da resistência ao *Tomato severe rugose virus* (gênero *Begomovirus*) em tomateiro – As begomoviroses estão entre as mais importantes doenças que afetam o cultivo do tomateiro no Brasil. Um dos métodos de controle mais promissores tem sido o uso de cultivares contendo genes de resistência/tolerância. O locus dominante *Ty-1* (introgridido da espécie selvagem *S. chilense*) tem sido a principal fonte de resistência empregada nos programas de melhoramento genético no mundo. Acessos e linhagens contendo o locus *Ty-1* apresentam resistência/tolerância a begomovírus monopartidos do complexo do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e para alguns vírus do complexo de espécies de genoma bipartido presente no Brasil, incluindo o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito na expressão fenotípica da resistência em tomateiros com distintas dosagens/configurações alélicas do locus *Ty-1* (homozigotas dominantes, heterozigotas e homozigotas recessivas) após inoculação com um isolado de ToSRV. Foi utilizada uma população segregante F₂ de 586 plantas derivadas de um cruzamento de duas linhagens quase isogênicas para o locus *Ty-1*. A inoculação foi feita via *Bemisia tabaci* aos 20 dias após semeio. Foram feitas duas avaliações: uma aos 44 e outra 87 dias após a inoculação. Foi utilizada uma escala de notas para descrever a severidade dos sintomas, variando de ausência de sintomas até enrugamento foliar severo e nanismo. Os marcadores moleculares codominantes do tipo “*cleaved amplified polymorphic sequence*” (CAPS) gerados pelo par de *primers* ‘UWTy1F’/‘UWTy1R’ (em estreita ligação genética com o locus *Ty-1* no cromossomo 6) foram empregados para categorizar a dosagem dessa região genômica. As notas da primeira e segunda avaliação para plantas que continham o locus dominante *Ty-1* em dupla dosagem (homozigotas) foram significativamente mais baixas do que as que continham apenas uma cópia do locus (heterozigotas). Por sua vez, plantas heterozigotas apresentaram notas mais baixas que as plantas duplo-recessivas (*ty-1/ty-1*). Desta forma, a associação do locus *Ty-1* aos níveis elevados de resistência/tolerância ao ToSRV foi confirmada no presente estudo. Esses resultados indicam que essa região do genoma do tomateiro apresenta um fator (ou grupamento de fatores genéticos) que controla um amplo espectro de tolerância/resistência contra distintas espécies do gênero *Begomovirus*. Os resultados também indicam aos programas de melhoramento do tomateiro que híbridos com uma melhor expressão fenotípica da tolerância/resistência ao ToSRV devem, sempre que possível, apresentar o alelo dominante *Ty-1* em homozigose.

Palavras-chaves: Tomateiro, efeito de dosagem, alelo *Ty-1*, *Begomovirus*.

ABSTRACT

Dosage effect of the genomic region harboring the *Ty-1* locus on the phenotypic expression of the resistant reaction to *Tomato severe rugose virus* (genus *Begomovirus*) in tomato – The begomoviruses are among the most important tomato diseases in Brazil. The most promising strategy for disease control is the employment of cultivars with genes of resistance/tolerance to this group of pathogens. The dominant locus *Ty-1* (introgressed from the wild species *S. chilense*) has been one of the most important sources of resistance in tomato breeding programs throughout the world. Accessions and inbred lines carrying this locus display high levels of resistance to monopartite begomovirus species of the *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) complex and also against some viruses of the bipartite species complex from Brazil, including *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). The objective of the present work was to evaluate the effect on the phenotypic expression after inoculation with one ToSRV isolate in tomato plants carrying distinct dosages/allelic states of the locus *Ty-1* (homozygous resistant, heterozygous, and homozygous recessive). For this analysis was employed a segregating F₂ population of 586 plants derived from a cross between two near isogenic lines contrasting for the *Ty-1* locus. Inoculation was carried out with 20-day-old plants using *Bemisia tabaci* adults. Two evaluations were carried out (44 and 87 days after inoculation) aiming to characterize the reaction to ToSRV. Evaluation was done by using a disease severity scale ranging from absence of symptoms to severe stunting. Codominant cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers obtained with the primer pair UWTy1F/UWTy1R (in tight linkage with *Ty-1* locus in chromosome 6) were employed to categorize the dosage of this genomic region. The group of plants with double dominant locus dosage (homozygous resistant) obtained a disease grade significantly lower than that of heterozygous plants in both evaluations. Heterozygous plants had also superior performance when compared with plants displaying double recessive locus dosage (*ty-1/ty-1*). Therefore, the association of the locus *Ty-1* with the high levels of ToSRV tolerance was confirmed, indicating that this tomato genomic region might have either one or a cluster of genes that control large-spectrum resistance/tolerance against distinct species within the genus *Begomovirus*. Our results also indicate to breeding programs that F₁ hybrids should have, whenever possible, both parental lines with the *Ty-1* locus in homozygous condition in order to have the best phenotypic tolerance/resistance expression against ToSRV isolates.

Key words: Tomato, dosage effect, *Ty-1* locus, *Begomovirus*.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) possui grande importância socioeconômica no Brasil devido à numerosa mão de obra requerida e à extensão da área cultivada (Melo *et al.*, 2009). As principais áreas de cultivo se encontram nos Estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia, sendo cultivado em todas as épocas do ano e em distintas condições edafoclimáticas (Melo *et al.*, 2009). No entanto, ES

se cultivo quase ininterrupto do tomateiro tem favorecido o aparecimento de diversas epidemias que diminuem a produção e afetam a qualidade dos frutos e da matéria prima. Essas doenças são causadas por vários patógenos, porém os vírus são os que apresentam maior dificuldade de controle. No Brasil, as doenças causadas por espécies virais do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são as que ocorrem em maior incidência e severidade na cultura do tomateiro (Boiteux *et al.*, 2012). As begomoviroses são disseminadas de maneira muito eficiente por um complexo de espécies crípticas de moscas-brancas relacionadas com *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (De Barro *et al.*, 2011).

Até meados da década de 1990, *B. tabaci* biótipo A e *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) eram as duas únicas espécies de moscas-brancas detectadas colonizando o tomateiro no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2003; Boiteux *et al.*, 2012). No entanto, novos relatos de doenças do tipo “mosaico dourado” e “mosaico rugoso” passaram a se intensificar no Brasil após a introdução de *B. tabaci* biótipo B (Ribeiro *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008). Cultivos com 100% de plantas sintomáticas foram regularmente observados em tomate para processamento industrial em diversas regiões do Brasil (Ribeiro *et al.*, 2003). Os principais sintomas das begomoviroses são enrolamento da folha, epinastia, mosaico-dourado, rugosidade foliar, cloroses nervais e internervais, e mosqueado que resultam em redução da floração, baixo pegamento de frutos, paralisação no crescimento e consequente perda na

produção, principalmente se a infecção ocorrer nos estádios iniciais de desenvolvimento (Giordano *et al.*, 2005a). O controle químico das begomoviroses (via aplicação de inseticidas) para reduzir a população do vetor tem sido pouco eficiente e muito oneroso tanto em tomateiro para processamento como para consumo *in natura*, sendo prejudicado pela constante migração de grandes populações do inseto de lavouras mais velhas para as mais novas (Harrison, 1985). Mais recentemente, tem sido relatada resistência de populações da mosca-branca a certos inseticidas (Horowitz *et al.*, 2007), ressaltando ainda mais a necessidade da busca por estratégias alternativas de manejo, incluindo o desenvolvimento e utilização de cultivares de tomateiro com resistência aos patógenos transmitidos por mosca-branca.

As principais estratégias de melhoramento genético têm sido buscar fontes com amplo espectro de resistência e/ou a “piramidização” de diferentes genes/loci de resistência em linhagens-elite. Diversas fontes de resistência a espécies de *Begomovirus* foram identificadas em espécies silvestres diploides ($2n = 2x = 24$) pertencentes ao gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*), a saber: locus *Ty-1*, introgridido de *S. chilense* ‘LA 1969’ (Zamir *et al.*, 1994); o locus *Ty-2*, identificado em acessos de *S. habrochaites* (Banerjee & Kalloo, 1987; Hanson *et al.*, 2000; Hanson *et al.*, 2006); o locus *Ty-3*, derivado de *S. chilense* ‘LA 2779’ (Ji *et al.*, 2007); o locus *Ty-4*, derivado de acessos de *S. chilense* (Ji *et al.*, 2009) e o locus dominante *Ty-5*, derivado de acessos de *S. peruvianum* (Anbinder *et al.*, 2009). A primeira fonte de resistência monogênica recessiva a begomovírus (*tcm-1*) foi caracterizada no Brasil em linhagens derivadas do híbrido comercial *S. lycopersicum* ‘Tyking’ (Giordano *et al.*, 2005b). Outros genes recessivos (denominados de *tgr-1* e *ty-5*) foram também caracterizados em linhagens derivadas de cruzamentos múltiplos envolvendo acessos de *S. chilense* e o híbrido comercial ‘Tyking’ (Bian *et al.*, 2007; Hutton *et al.*, 2012; Kadirvel *et al.*, 2012). O locus *ty-5* foi mapeado no cromossomo 4 do tomateiro e controla resistência contra isolados

de TYLCV da Flórida, Estados Unidos (Hutton *et al.*, 2012).

Acessos e linhagens contendo o locus/gene *Ty-1* mostraram-se efetivos contra diferentes isolados de diferentes espécies de *Begomovirus* monopartidos e bipartidos em vários continentes (Laterrot, 1993; Zamir *et al.*, 1994; Boiteux *et al.*, 2007a). Este gene interfere na proteína viral responsável pela circulação do vírus na planta (movimento célula-a-célula), se mostrando bastante eficiente em condições de baixa pressão de inóculo (Laterrot, 1993; Michelson *et al.*, 1994; Zamir *et al.*, 1994). *Ty-1* foi mapeado e posicionado no topo do cromossomo 6, próximo da região do centrômero (De Castro *et al.*, 2007; Verlaan *et al.*, 2011). O locus está ligado em repulsão com o gene *Mi* que confere resistência a diferentes espécies de nematóides do gênero *Meloidogyne* em uma região conhecida pelos baixos níveis de recombinação (Zamir *et al.*, 1994). Essa localização em repulsão tem dificultado a obtenção de linhagens com o gene *Mi* e o locus *Ty-1* em homozigose (De Castro *et al.*, 2007; Verlaan *et al.*, 2011). Mais recentemente, análises empregando “*Fluorescence in situ hybridization*” (FISH) e progênies recombinantes para o locus *Ty-1* indicaram seu posicionamento entre os marcadores MSc05732-4 e MSc05732-14, um segmento do genoma onde o locus *Ty-3* também foi mapeado, indicando que *Ty-1* e *Ty-3* podem estar fortemente ligados ou mesmo representar distintos alelos de um mesmo gene (Verlaan *et al.*, 2011). Essa informação foi recentemente confirmada e um gene codificador de uma polimerase RNA-dependente de RNA da classe DFDGD foi determinado como sendo o fator de resistência associado com o locus *Ty-1* (Verlann *et al.*, 2013).

No entanto, uma questão de extremo interesse para guiar os programas de melhoramento genético visando à produção de híbridos ainda permanece não completamente elucidada. Essa questão se refere à determinação se a dosagem do locus dominante *Ty-1* apresenta efeitos significativos na expressão fenotípica da resistência/tolerância contra espécies de genoma bipartido presentes no Brasil. Para conduzir tais estudos comparativos se

faz necessário a disponibilidade isolinhas homozigotas para o locus *Ty-1* e para o alelo recessivo *ty-1* e de populações segregantes derivadas dos cruzamentos dessas duas isolinhas contrastantes. Além disso, se faz necessário também a disponibilidade de uma coleção de marcadores moleculares codominantes em estreita ligação genética com essa região genômica (Maxwell *et al.*, 2006; Nizio *et al.* 2008; Verlaan *et al.*, 2011; González-Cabezuelo *et al.*, 2012). Essas ferramentas estão agora disponíveis viabilizando a condução desse tipo de estudos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dosagem do gene/locus *Ty-1* na expressão fenotípica da resistência/tolerância em plantas de tomateiro a um isolado de ToSRV (uma das principais espécies virais de genoma bipartido presentes no Brasil), utilizando uma população F₂ derivada do cruzamento de duas linhagens isogênicas que segregam para esse segmento do genoma do tomateiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de condução dos ensaios.

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Melhoramento Genético de Hortaliças e de Análise Genômica e em casas de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças), sediado em Brasília-DF.

2.2. Obtenção de uma população segregante para o locus *Ty-1*.

Para o estudo foi utilizada uma população F₂ obtida da seguinte maneira: durante sete gerações foi realizada a autofecundação de plantas individuais do híbrido ‘BS 1012837’ (Royal Sluis). Uma linhagem S₇ heterozigota (denominada inicialmente como LAM 144) foi então autofecundada para obter pares de linhagens contrastantes: uma homozigota resistente (*Ty-1/Ty-1*, denominada LAM 144-R) e outra homozigota suscetível (*ty-1/ty-1*, denominada

de LAM 144-S). Desta forma, LAM 144-R e LAM 144-S são consideradas, do ponto de vista genético, como duas linhagens quase isogênicas. Fez-se então um cruzamento entre LAM 144-S (usada como parental feminino) x LAM 144-R (parental masculino ou doador de pólen) para obtenção da geração F₁. Um único indivíduo F₁ foi autofecundado para gerar uma população de 586 plantas F₂ (população DD F₂) que foi utilizada no presente estudo.

2.3. Semeadura, transplântio, inoculação, avaliação e confirmação do inóculo.

A semeadura foi realizada em bandejas de isopor com 128 células, utilizando um substrato composto por vermiculita expandida, casca de *Pinus* e casca de arroz carbonizada e suplementado com fertilizantes. Colocou-se uma ou duas sementes por célula, recobrando-as em seguida com substrato peneirado. A inoculação foi feita com moscas-brancas virulíferas, contaminadas com um isolado de ToSRV, aos 20 DAS (dias após semeadura) e aos 30 DAS foi feito o transplântio para vasos com capacidade de 5 litros contendo solo autoclavado devidamente adubado e com pH corrigido. Foram feitas duas avaliações, uma aos 44 dias após a inoculação (DAI) e outra aos 87 DAI. Os fenótipos das plantas inoculadas foram avaliados de acordo com a escala de notas adaptada de Lapidot *et al.* (2006) onde: nota 0= ausência de sintomas; nota 1= amarelecimento suave restrito às folhas apicais; nota 2= amarelecimento mais acentuado e enrolamento dos folíolos; nota 3= muitas folhas com amarelecimento, enrolamento, alguma redução no tamanho, contudo as plantas continuam se desenvolvendo; nota 4= amarelecimento e enrolamento foliar severos e paralisação do crescimento/nanismo. Para confirmação da pureza do inóculo amostras de DNA total de tecidos foliares de plantas inoculadas foram extraídas e um segmento do componente do DNA-A do vírus foi amplificado via PCR utilizando os *primers* degenerados ‘PAL1v1978’ (5’-GCA-TCT-GCA-GGC-CCA-ACT-YGT-CTT-TYC-CNG-T-3’) e ‘PARc715’ (5’-GAT-TTC-TGC-AGT-TDA-TRT-TYT-CRT-CCA-TCC-A- 3’), que têm sido empregados para

detecção universal de espécies do gênero *Begomovirus* (Rojas *et al.*, 1993). Uma alíquota do produto de PCR foi diretamente sequenciado usando o kit Big-DyeIII em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) do laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças. A análise das sequências foi feita empregando o algoritmo BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e as sequencias foram alinhadas pelo método Clustal W dentro do aplicativo LaserGene (Madison, WI).

2.4. Extração de DNA de plantas da população segregante para o locus *Ty-1*.

As amostras foliares foram coletadas do ápice das plantas inoculadas e mantidas em casa de vegetação. O DNA total foi extraído individualmente de cada planta de acordo com a metodologia de CTAB 2X com algumas modificações (Boiteux *et al.*, 1999). Em cada tubo foram colocadas seis esferas metálicas, juntamente com pequena quantidade homogênea de tecido de folhas. Acrescentou-se aos tubos 250 µL de CTAB e as amostras foram trituradas no Precellys[®]24. Após 30 segundos a 5000 rpm, as amostras foram retiradas e colocadas em banho-maria a 65°C durante 10 minutos; acrescentou-se, após esse tempo, 750 µL de clorofil em cada tubo e as amostras foram agitadas em vortex por aproximadamente 30 segundos, seguido de um ciclo de centrifugação à 9000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente, os tubos foram retirados da centrífuga e 600 µL do sobrenadante foram retirados e colocados em novos tubos de micro-centrífuga. Foram acrescentados 300 µL de isopropanol gelado e com a finalidade de homogeneizar, os tubos foram suavemente agitados de forma manual e posteriormente centrifugados a 13000 rpm durante 13 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o ‘pellet’ lavado com álcool 70%, de forma cuidadosa, para evitar a sua ressuspensão. Os tubos foram então colocados em estufa a 37°C por 20 minutos e ressuspensos em 100 µL de TE+RNase, armazenando os tubos na geladeira. No dia seguinte, as amostras foram agitadas no vortex e os DNAs então extraídos foram guardados em freezer (-20°C). As quantificações

de DNA foram feitas visualmente através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (1,5 µL/100 mL de gel), comparando com amostras de concentração conhecida de DNA λ (20 a 400 ng).

2.5. Reação de PCR e clivagem com enzima de restrição para geração de marcadores codominantes do tipo “*cleaved amplified polymorphic sequence*” (CAPS).

O DNA total foi extraído de plantas individuais e utilizados em ensaios de PCR com o par de *primers* ‘UWTy1F’ (5’- ATA-AGC-ATT-TCA-TGT-CAG-ATG-TCT-A -3’) e ‘UWTy1R’ (5’- CTA-GAT-CCT-GGA-TGA-CTT-CAA-TAG-C -3’), capazes de detectar amplicons polimórficos entre o locus de resistência (*Ty-1*) e o locus de suscetibilidade (*ty-1*) após clivagem com a enzima de restrição *Taq-1* (Maxwell *et al.*, 2006). Esses marcadores moleculares codominantes do tipo CAPS são derivados da informação de sequência de um marcador RFLP (“*restriction fragment length polymorphism*”), denominado de TG97, previamente detectado em estreita ligação com um segmento do cromossomo 6 onde está posicionado o locus *Ty-1* (introgrado do acesso *S. chilense* ‘LA-1969’) (Zamir *et al.*, 1994). O mix da reação constituiu de 1,25 µL de Tampão 10X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 1,25 µL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,5 µL de cada primer, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,2 µL da enzima *Taq* Polimerase (5 U/µL, Invitrogen), 5,05 µL de água Milli-Q e 3 µL de DNA (20 ng/µL), totalizando um mix com 12,5 µL de volume final. As amplificações foram efetuadas em termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 programado para 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído pelos seguintes parâmetros: Etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 35 ciclos – desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 53°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto – e finalização com uma etapa de extensão ajustada para 72°C durante 10 minutos. Os amplicons obtidos após os ensaios de PCR foram então clivados com a enzima de

restrição *Taq-1*, visando revelar os alelos alternativos (resistente vs. suscetível) para o locus *Ty-1*. O mix da enzima de restrição apresentou a seguinte composição: 0,9 µL de água Milli-Q, 1,5 µL do tampão 10X e 0,1 µL da enzima de restrição *Taq-1* (10 U/µL, Invitrogen), totalizando um volume final de 2,5 µL. O regime de tempo utilizado pela enzima foi de quatro horas a temperatura constante de 65°C. Foram adicionados 5 µL de azul de bromofenol em cada amostra e estas foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, já suplementado com brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM e 1 mM EDTA), a 120V, por um período de aproximadamente 3 horas. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, tendo-se utilizado o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder[®] (Invitrogen) para análise dos produtos obtidos.

2.6. Padrão de segregação dos marcadores codominantes do tipo “*cleaved amplified polymorphic sequence*” (CAPS).

O padrão de segregação observado através da genotipagem da F₂ foi analisado para adequação a razões mendelianas de acordo com o teste qui-quadrado (χ^2):

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

Onde: o = frequência observada de uma classe fenotípica/genotípica; e = frequência esperada de uma classe fenotípica/genotípica; Σ = somatório dos valores da expressão. É proposta uma hipótese nula H₀, onde as frequências observadas não são diferentes das frequências esperadas. Essa hipótese pode ser aceita (desvio observado é atribuído somente ao acaso) ou rejeitada (desvio não é apenas ao acaso). É necessário obter duas estatísticas denominadas χ^2 calculado e χ^2 tabelado. As frequências observadas são obtidas diretamente dos dados das amostras, enquanto as frequências esperadas são calculadas a partir destas. Assim, o χ^2 calculado é obtido a partir dos dados experimentais, levando-se em consideração

os valores observados e os esperados, tendo em vista a hipótese. Já o χ^2 tabelado depende do número de graus de liberdade e do nível de significância adotado. A tomada de decisão é feita comparando-se os dois valores de χ^2 . Se χ^2 calculado $>$ ou $=$ χ^2 tabelado: Rejeita-se H_0 . Por sua vez, se χ^2 calculado $<$ χ^2 tabelado aceita-se H_0 , o que significa que o desvio observado é atribuído somente ao acaso (Schuster & Cruz, 2008).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização fenotípica da reação ao ToSRV.

Ao todo foram avaliadas 586 plantas, que correspondem à totalidade da população segregante DD F₂ que, após inoculação, foi conduzida em condições de telado (**Figura 1**). Na primeira avaliação (44DAI) foi atribuída nota zero (= ausência de sintomas) para 102 plantas, nota 1 (= amarelecimento suave restrito às folhas apicais) para 176 plantas, nota 2 (= amarelecimento mais acentuado e enrolamento dos folíolos) para 137 plantas, notas 3 (= amarelecimento intenso, enrolamento, sem redução drástica no porte da planta) para 112 e nota 4 (= nanismo, amarelecimento/enrolamento foliar severo com paralisação do crescimento) para 59 plantas. Na segunda avaliação (87 DAI) foi atribuída nota zero para 111 plantas, nota 1 para 163, nota 2 para 136 plantas, nota 3 para 101 e nota 4 para 75 plantas (**Figura 2**).



Figura 1 – Aspecto do telado onde foi conduzido o ensaio para avaliação da resposta ao *Tomato severe rugose virus* de plantas de tomate individuais da população DD F₂.

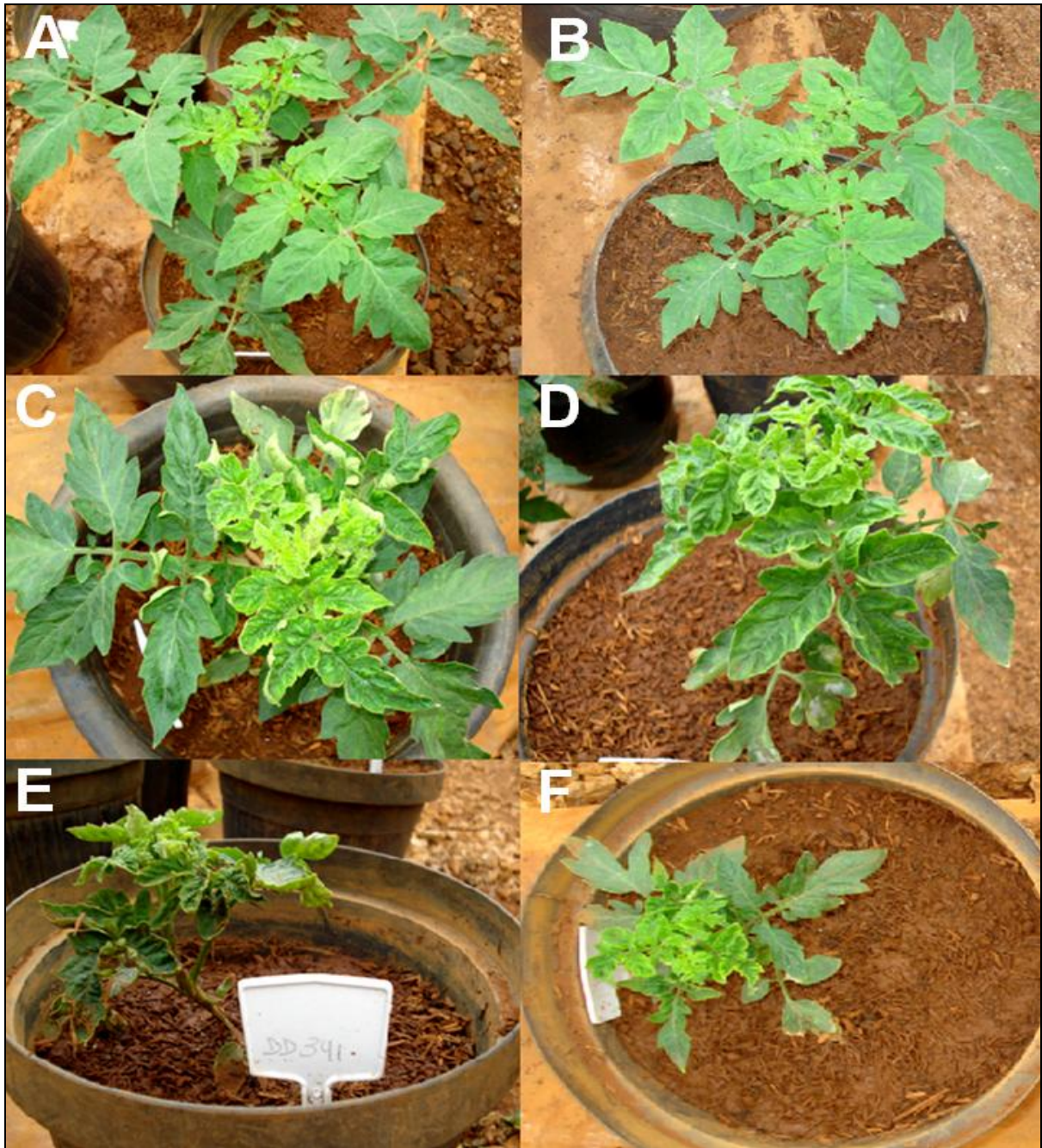


Figura 2 – Fenótipo das plantas de tomate infectadas, mostrando os diferentes sintomas de acordo com a escala de notas adaptada de Lapidot *et al.* (2006), onde: nota **0** = ausência de sintomas (**A**); nota **1** = amarelecimento suave restrito às folhas apicais (**B**); nota **2** = amarelecimento mais acentuado e enrolamento dos folíolos (**C**); nota **3** = muitas folhas com amarelecimento, enrolamento, alguma redução no tamanho, contudo as plantas continuam se desenvolvendo (**D**); nota **4** = amarelecimento/enrolamento foliar severo e nanismo (**E & F**).

3.2. Caracterização genotípica e padrão de segregação de um marcador CAPS ligado ao locus *Ty-1*.

O padrão de amplicons após PCR com o par de *primers* ‘UWTy1F’ / ‘UWTy1R’ foi de uma única banda de aproximadamente 450 pb. No entanto, após clivagem com a enzima de restrição *Taq-1*, as plantas apresentaram três distintos padrões de bandas, idênticos aos descritos por Maxwell *et al.* (2006): uma banda intacta (não clivada) de 450 pb associada com indivíduos homozigotos suscetíveis; duas bandas (320 pb e 150 pb), resultando da clivagem completa pela *Taq-1* de todos os produtos de PCR para indivíduos homozigotos resistentes e três bandas (450 pb, 320 pb e 150 pb) para indivíduos heterozigotos, que possuem as duas variantes alélicas do marcador (**Figura 3**). Nesse ensaio de genotipagem, do total de 586 plantas da população DD F₂ foram observadas as seguintes frequências de classes genotípicas: 117 plantas apresentaram genótipo associado com plantas homozigotas resistentes (bandas 320 pb + 150 pb); 307 genótipos associados com plantas heterozigotas (450 pb + 320 pb + 150 pb) e 162 genótipos associados com plantas homozigotas suscetíveis (presença exclusiva da banda de 450 pb).

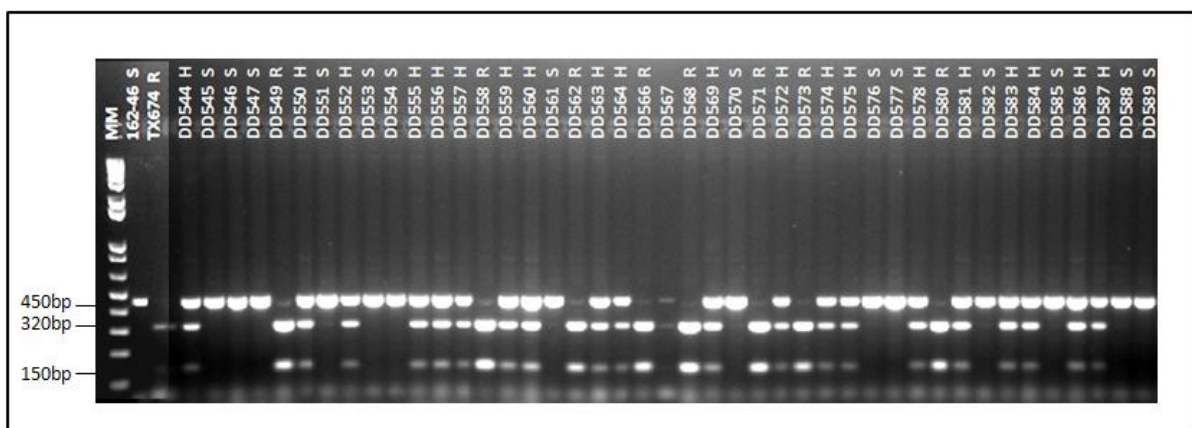


Figura 3 – Perfil de fragmentos de DNA gerados após clivagem com enzima de restrição *Taq-1* dos amplicons gerados com os marcadores CAPS obtidos com o par de primers ‘UWTy1F’ / ‘UWTy1R’ de uma amostra de plantas F₂ da população DD. Indivíduos homozigotos resistentes (R) apresentam duas bandas (150 pb e 320 pb); indivíduos homozigotos suscetíveis (S) apresentam apenas uma banda (450 pb) e os indivíduos

heterozigotos (H) apresentam três bandas (450 pb, 320 pb e 150 pb). A linhagem ‘162-46S’ foi utilizada como controle homocigoto suscetível e controle resistente foi ‘Tx674R’. Análise em gel de agarose 1,5%. MM – Marcador Molecular 1Kb Plus DNALadder (Invitrogen).

3.3. Padrão de segregação para a resposta ao ToSRV.

O padrão mendeliano esperado para marcadores codominantes em populações F₂ é de 1:2:1 (AA: Aa: aa) (Collard *et al.*, 2005). Neste trabalho foi calculado o teste qui-quadrado para as classes genóticas e fenotípicas. O padrão das classes genóticas não se adequou ao modelo mendeliano 1:2:1, já que o valor calculado encontrado foi maior que o valor tabelado com grau de liberdade (GL) de 2 e probabilidade (P) de 0,05 (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Análise da segregação da resistência a *Tomato severe rugose virus* e sua associação com o padrão de marcadores moleculares CAPS gerados com o par de *primers* ‘UWTy1F’/‘UWTy1R’ (Maxwell *et al.*, 2006), de acordo com o padrão mendeliano de 1:2:1. Esses marcadores estão em estreita ligação com um segmento do cromossomo 6 onde está posicionado o locus *Ty-1* (introgredido do acesso *S. chilense* ‘LA-1969’).

Classes Genóticas	Valor esperado de cada classe	Valor calculado de cada classe	χ^2_{calc}	χ^2_{tab}
AA (1)	146,5	117,0	6,0	
Aa (2)	293,0	307,0	0,6	
aa (1)	146,5	162,0	1,6	
Total	586,0	586,0	8,2	7,8*

* Valor encontrado para GL= 2 e P = 0,05.

A distribuição genotípica melhor se adequou, contudo, ao padrão mendeliano 3:1 (A:aa), onde o valor tabelado, 3,84, com GL=1 e P= 0,05 foi maior que o valor calculado de 2,17. Portanto a hipótese H₀ é aceita (**Tabela 2**). Esse padrão é esperado para marcadores dominantes em populações F₂ (Collard *et al.*, 2005). Para o fenótipo, o padrão de distribuição de notas observado, não se adequou a nenhum modelo mendeliano.

Tabela 2 – Análise da segregação da resistência a *Tomato severe rugose virus* e sua associação com o padrão de marcadores moleculares CAPS gerados com o par de *primers* ‘UWTy1F’ / ‘UWTy1R’ (Maxwell *et al.*, 2006), de acordo com o padrão mendeliano de 3:1. Esses marcadores estão em estreita ligação com um segmento do cromossomo 6 onde está posicionado o locus *Ty-1* (introgredido do acesso *S. chilense* ‘LA-1969’).

Classes Genotípicas	Valor esperado de cada classe	Valor calculado de cada classe	χ^2 calc	χ^2 tab
A_ (3)	439,5	424,0	0,5	
AA (1)	146,5	162,0	1,6	
Total	586,0	586,0	2,1	3,8*

* Valor encontrado para GL=1 e P=0,05.

3.4. Associação entre fenótipo de resistência/tolerância ao ToSRV e a configuração alélica do marcador CAPS codominante na primeira avaliação (44 DAI).

Na primeira avaliação, das 117 plantas classificadas como **homozigotas resistentes** (*Ty-1/Ty-1*) de acordo com o marcador ‘UWTy1F’/‘UWTy1R’ 54,7% apresentaram sintomas atenuados (= notas 1 ou 2). A nota 3 foi atribuída apenas para dois indivíduos (DD92 e DD448) que apresentaram folhas com amarelecimento, enrolamento e redução no tamanho, apesar de continuaram se desenvolvendo. Nenhuma planta foi fenotipada com sintomas severos e paralisação do crescimento mesmo 84 dias após a inoculação. Todas as demais plantas (43,6 %) não apresentaram nenhum sintoma evidente de infecção por begomovírus. Das 307 plantas classificadas como **heterozigotas** (*Ty-1/ty-1*) de acordo com o marcador ‘UWTy1F’/‘UWTy1R’ 16,6% delas não mostraram sintoma algum; 2,6% delas apresentaram um fenótipo/nota 3 e uma planta apresentou nota 4 (DD132). É interessante mencionar que na segunda avaliação o indivíduo DD132 foi fenotipado com nota 3, reação caracterizada como uma recuperação ou “recovery”, fenômeno observado em diferentes interações/patossistemas begomovírus/plantas hospedeiras (Vanitharani *et al.*, 2005). As demais plantas apresentaram notas entre 1 e 2, ou seja, gradação de sintomas atenuados. Nenhum dos 162 indivíduos

classificados como **homozigotos suscetíveis** (*ty-1/ty-1*) de acordo com o marcador ‘UWTy1F’/‘UWTy1R’ apresentou ausência total de sintomas (nota zero) ou amarelecimento suave. Apenas dois indivíduos (DD 318 e DD 650) apresentaram nota 2, sendo que esses dois indivíduos na segunda avaliação, foram fenotipados com nota 3. Mais da metade, dos homozigotos suscetíveis (62,96%), apresentou nota 3 e 35,80% tiveram nanismo severo e paralisação do crescimento (nota 4).

3.5. Associação entre fenótipo de resistência/tolerância ao ToSRV e a configuração alélica do marcador CAPS codominante na segunda avaliação (87 DAI).

Na segunda avaliação, das 117 plantas genotipadas como homozigotas resistentes para o marcador CAPS: 57,26% das plantas apresentaram sintomas atenuados (38 indivíduos com nota 1 e 29 indivíduos com nota 2). Os indivíduos DD92 e DD448 mantiveram a nota 3, que foi observada na primeira avaliação. Os indivíduos DD57, DD77, DD81, DD268 e DD608, anteriormente observados com as respectivas notas 1, 1, 0, 2 e 2, nesta segunda avaliação foram fenotipadas com nota 3. Nenhuma planta apresentou sintomas severos com paralisação do crescimento, mantendo o padrão observado na primeira avaliação. O restante das plantas - 36,76% - não apresentou sintomas, contudo houve desenvolvimento de sintomas em plantas anteriormente avaliadas como “imunes”. Das 307 plantas que foram genotipadas como heterozigotas: 22,14% não apresentaram sintomas, o que representa um aumento em relação à primeira avaliação, mostrando que algumas plantas foram capazes de “superar” a infecção pelo vírus; 2,93% mostraram-se suscetíveis (sete plantas com nota 3 e duas plantas com nota 4 (DD552 e DD638), estas plantas na primeira avaliação foram fenotipadas com nota 3. Em relação às plantas genotipadas como homozigotas suscetíveis, a situação se manteve a mesma observada na primeira avaliação em relação às notas zero e 1, ou seja, nenhuma planta com ausência de sintomas ou pouco amarelecimento nas folhas apicais, respectivamente, foi

genotipada como homozigota suscetível. Dois indivíduos que anteriormente apresentaram notas 4 e 3, DD 386 e DD 395, respectivamente, nessa segunda avaliação apresentaram superação dos sintomas, sendo agora fenotipados com nota 2. O total de indivíduos com notas 3 e 4 corresponde a 98,76% do total de indivíduos com genótipo suscetível. Em relação à primeira avaliação houve uma diminuição de indivíduos com nota 3 e aumento de indivíduos com nota 4, o que pode ser explicado devido ao aumento da pressão de inóculo (**Tabela 3**). As notas de severidade da infecção por ToSRV das plantas homozigotas resistentes, heterozigotas e homozigotas suscetíveis, diferiram entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% nas duas avaliações. As médias das notas para cada genótipo foram transformadas e determinadas em ambos os ensaios e estão apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 3 – Análise da distribuição de classes de reação ao *Tomato severe rugose virus* e sua associação com marcadores moleculares CAPS (gerados com os *primers* ‘UWTy1F’ / ‘UWTy1R’) em estreita ligação com um segmento do cromossomo 6 onde está posicionado o locus *Ty-1*. As notas de severidade foram atribuídas em duas avaliações de acordo com uma escala adaptada de Lapidot *et al.* (2006). A primeira (1ª) coluna representa o valor médio para cada classe genotípica na avaliação conduzida aos 44 dias após a inoculação (DAI) e a segunda (2ª) coluna representa a média da segunda avaliação aos 87 DAI, respectivamente.

CLASSES GENOTÍPICAS								
CLASSES FENOTÍPICAS (notas)	<i>Ty-1/ Ty-1</i>		<i>Ty-1/ty-1</i>		<i>ty-1/ty-1</i>		Total de plantas avaliadas	
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
0	051	043	051	068	000	000	102	111
1	048	038	128	125	000	000	176	163
2	016	029	119	105	002**	002**	137	136
3	002*	007*	008*	007*	102	087	112	101
4	000	000	001*	002*	058	073	059	075
Total de plantas avaliadas	117	117	307	307	162	162	586	586

*Potenciais recombinantes entre o marcador CAPS e o fator de resistência/tolerância ao ToSRV.

**Não foram os mesmo indivíduos.

Tabela 4 – Configurações alélicas contrastantes do locus *Ty-1* de acordo com o padrão dos marcadores moleculares do tipo “*cleaved amplified polymorphic sequence*” (CAPS) gerados com o par de *primers* ‘UWTy1F’ / ‘UWTy1R’ e as correspondentes médias de severidade atribuídas com uma escala de notas de 0 a 4 adaptada de Lapidot *et al.* (2006). Foram conduzidas duas avaliações aos 44 e 87 dias após a inoculação (DAI).

Configuração alélica	Total de indivíduos avaliados	M.N.T.¹.(R.T.²) 1ª avaliação (44 DAI)	M.N.T.(R.T.) 2ª avaliação (87 DAI)
<i>ty-1/ ty-1</i>	162	1.96 (3.34) a*	1.98 (3.42) a
<i>Ty-1/ ty-1</i>	307	1.30 (1.19) b	1.25 (1.07) b
<i>Ty-1/ Ty-1</i>	117	1.06 (0.62) c	1.16 (0.85) c
CV (%)		19.9	21.6

¹ M.N.T. – Médias Notas Transformadas; ² R.T. – Notas Retransformadas

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, segundo teste de Tukey (5%).

4. DISCUSSÃO

A natureza codominante do marcador CAPS ‘UWTy1F’ / ‘UWTy1R’ permitiu estimar o efeito de dosagem dessa região genômica na expressão fenotípica da resistência a um isolado de ToSRV. As análises indicaram que as plantas que continham o alelo/locus de resistência em dupla dosagem (i.e. homozigotas resistentes) foram significativamente mais baixas do que as que continham apenas uma cópia do alelo/locus (heterozigotas). Por sua vez, plantas heterozigotas apresentaram notas significativamente mais baixas que as plantas duplo-recessivas (*ty-1/ty-1*). Desta forma, os programas de melhoramento do tomateiro visando o desenvolvimento de híbridos com uma melhor expressão fenotípica da tolerância/resistência ao ToSRV devem, sempre que possível, apresentar o alelo dominante *Ty-1* em homozigose. Os níveis elevados de resistência/tolerância ao ToSRV estiveram fortemente associados com o locus *Ty-1*, indicando que essa região do genoma do tomateiro apresenta um fator ou grupamento de fatores genéticos que controlam um amplo espectro de tolerância/resistência

contra distintas espécies do gênero *Begomovirus*. A resistência ao ToSRV é de extrema importância uma vez que essa espécie viral apresenta ampla dispersão geográfica (Fernandes, 2010) e grande incidência e severidade em tomateiro (Pereira-Carvalho *et al.*, 2010). O locus *Ty-1*, como pôde ser avaliado neste trabalho, não pode ser considerado como um locus que confere resistência em termos de ausência total de sintomas, mas sim tolerância, permitindo que ocorra infecção pelo vírus em plantas com introgressão de *S. chilense* e que haja gradação de sintomas entre o descrito pela escala de zero até 2 e em pouquíssimos casos nota 3. A ausência completa de sintomas foi observada em poucas plantas. Em sete plantas antes avaliadas com notas de severidade da doença baixas (variando de zero a 2) e genotipadas como resistentes homocigotas, ou seja, com o locus dominante *Ty-1* em dupla dosagem, na segunda avaliação aos 87 DAI, foram avaliadas com nota 3, evidenciando que o efeito desse locus de resistência pode variar bastante em relação à expressão de sintomas pela planta.

Um conjunto de pelo menos três dezenas de diferentes tipos de marcadores moleculares em estreita ligação genética com o locus *Ty-1* foi descrito em diferentes estudos (Verlaan *et al.*, 2011; González-Cabezuelo *et al.*, 2012), incluindo o marcador CAPS codominante (UWTy1F/UWTy1R) utilizado no presente estudo (Maxwell *et al.*, 2006). Esse marcador CAPS foi obtido pela conversão da informação genética de um marcador do tipo RFLP denominado TG-97. A exata localização do marcador TG-97 tem sido objeto de novos estudos, especialmente após o sequenciamento completo do genoma do tomateiro (The Tomato Genome Consortium, 2012). De acordo com a base dados do SOL Genomics Website (<http://solgenomics.net>), o marcador TG-97 está localizado no topo do cromossomo 6 em estreita ligação genética com o locus *Ty-1*. A estreita ligação genética (cM), não significa, no entanto, estreita ligação física (distância em números de pares de bases), uma vez que o segmento introgridido de *S. chilense* contendo o locus *Ty-1* se encontra em torno da região do centrômero do cromossomo 6, que apresenta supressão de recombinação (Verlaan *et al.*,

2011), sendo assim, o segmento é herdado de geração em geração como um todo. Por exemplo, a distância física de TG-97 para o gene *Mi* (que está ligado em repulsão com o locus *Ty-1*) é de aproximadamente 3 milhões de bases (<http://solgenomics.net>). Essa peculiaridade genética tem dificultado os trabalhos de isolamento do fator de resistência condicionada pelo locus *Ty-1* via clonagem posicional (mapeamento). De fato, embora todos os esforços despendidos, o gene *Ty-1* não foi ainda isolado e caracterizado. Essa supressão de recombinação é um fator limitante para a obtenção de linhagens com resistência múltipla a nematóides-das-galhas e begomovírus. Até o presente momento, todos os acessos avaliados têm apresentado os loci *Ty-1* e *Mi* ligados em repulsão (Zamir *et al.*, 1994; De Castro *et al.*, 2007). Os solos tropicais e subtropicais são frequentemente infestados com espécies de *Meloidogyne* e o emprego de híbridos homozigotos para o *Ty-1* pode resultar em perdas econômicas devido à infecção por este grupo de patógenos de solo. Todos os esforços no sentido de tentar ‘quebrar’ a ligação em repulsão do locus *Ty-1* com o gene *Mi* serão de extrema importância no ponto de vista do melhoramento genético do tomateiro (Boiteux *et al.*, 2007a).

A análise do padrão de bandas geradas pelo marcador ‘UWTy1F’ / ‘UWTy1R’ permitiu identificar alguns indivíduos potencialmente recombinantes para essa região genômica. Indivíduos altamente suscetíveis foram identificados com a configuração *Ty-1/Ty-1* e indivíduos isentos de sintomas foram identificados com a configuração *ty-1/ty-1*. Esses dados estão de acordo com as observações de Nizio *et al.* (2008) que também identificaram algumas plantas homozigotas (utilizando o marcador SSR-47 também ligado ao locus *Ty-1*) com sintomas de infecção sistêmica. A população DD F₂ tem uma característica de interesse para estudos genéticos e de mapeamento molecular, podendo ser doadora de fatores de resistência para desenvolvimento de novos cultivares comerciais, já que possui, aparentemente, um menor evento de introgressão do acesso selvagem *S. chilense* ‘LA-1969’

uma vez que é desprovida dos marcadores ligados ao locus *Ty-3* que se encontra em estreita ligação com o locus *Ty-1* em outros eventos de introgressão (Verlaan *et al.*, 2011). Ou seja, DD F₂ pode ter um menor número de genes oriundos da espécie selvagem e, por consequência, potencialmente deletérios no ponto de vista do melhoramento genético do tomateiro domesticado. A incorporação do locus *Ty-1* em linhagens-elite utilizando para tal a população DDF₂ como fonte doadora pode aumentar a eficiência na obtenção de linhagens elite com tolerância/resistência a begomovirose.

Distintas fontes de resistência contra espécies de begomovírus têm sido utilizadas em diferentes programas de melhoramento genético no mundo. O locus *Ty-2* (introgridido de *S. habrochaites*) tem demonstrado boa eficiência contra isolados brasileiros (Boiteux *et al.*, 2007b). O gene/locus *Ty-3* (parcialmente dominante e derivado de *S. chilense* ‘LA-2779’) confere alto nível de resistência a TYLCV e resistência intermediária a isolados de espécies de genoma bipartido na Flórida (Ji *et al.*, 2007). O gene *tcm-1* (derivado de *S. lycopersicum* ‘Tyking’) tem se mostrado efetivo contra begomovírus de genoma bipartido do Brasil (Giordano *et al.*, 2005b) e monopartido da Europa (García-Cano *et al.*, 2008). Outros genes recessivos foram também caracterizados em linhagens derivadas de cruzamentos múltiplos envolvendo acessos de *S. chilense* e o híbrido comercial ‘Tyking’ (Bian *et al.*, 2007; Hutton *et al.*, 2012). O locus *tgr-1* se mostrou efetivo contra isolados de begomovírus da Austrália (Bian *et al.*, 2007) enquanto o locus *ty-5* foi mapeado no cromossomo 4 do tomateiro e controla elevados níveis de resistência contra isolados de TYLCV da Flórida, Estados Unidos (Hutton *et al.*, 2012). No entanto, a natureza recessiva destas fontes de resistência dificulta a incorporação dessa característica em linhagens e, especialmente, em híbridos.

Neste cenário, o locus *Ty-1* se destaca em relação a todas as outras fontes de resistência pela sua amplitude de eficiência, facilidade de incorporação e a grande disponibilidade de ferramentas para seleção assistida (De Castro *et al.*, 2007; Verlaan *et al.*, 2011; González-

Cabezuelo *et al.*, 2012). Acessos e linhagens contendo o locus/gene *Ty-1* têm se mostrado efetivos contra diferentes isolados de diferentes espécies de *Begomovirus* monopartidos e bipartidos em vários continentes (Zamir *et al.*, 1994; Santana *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2003; Boiteux *et al.*, 2007a). Este gene interfere na proteína viral responsável pela circulação do vírus na planta (movimento célula-a-célula), se mostrando bastante eficiente em condições de baixa pressão de inóculo (Laterrot, 1993; Michelson *et al.*, 1994; Zamir *et al.*, 1994). O nível de tolerância aos begomovírus pode ser aumentado em híbridos de tomateiro homozigotos para o locus *Ty-1*, entretanto, eles apresentam uma importante limitação no sentido de não poder aportar resistência a espécies de *Meloidogyne*, outro importante grupo de patógenos, devido à indesejada ligação em fase de repulsão entre locus *Ty-1* e o gene *Mi* (Zamir *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 2000). *Ty-1* foi mapeado e posicionado no topo do cromossomo 6, próximo da região do centrômero (De Castro *et al.*, 2007; Verlaan *et al.*, 2011). O locus está ligado com o gene *Mi* que confere resistência a diferentes espécies de nematoides do gênero *Meloidogyne* (Zamir *et al.*, 1994), em uma região conhecida pelos baixos níveis de recombinação fato que tem dificultado a obtenção de linhagens com os dois loci em fase de associação (De Castro *et al.*, 2007; Verlaan *et al.*, 2011). Além disso, análises mais recentes empregando FISH e progênies recombinantes para o locus *Ty-1* indicaram seu posicionamento entre os marcadores MSc05732-4 e MSc05732-14, um segmento do genoma onde o locus *Ty-3* também foi mapeado, indicando que *Ty-1* e *Ty-3* podem estar fortemente ligados ou mesmo representar alelos de um mesmo gene (Verlaan *et al.*, 2011). Essa informação foi recentemente confirmada e um gene codificador de uma polimerase RNA-dependente de RNA da classe DFDGD foi determinado como sendo o fator de resistência associado com o locus *Ty-1* (Verlaan *et al.*, 2013).

5. CONCLUSÕES

Marcadores moleculares codominantes em estreita ligação genética permitiram estimar o efeito de dosagem da região genômica contendo o locus *Ty-1* na expressão fenotípica da resistência a um isolado de ToSRV. Os resultados indicaram que plantas contendo o alelo/locus de resistência em dupla dosagem foram significativamente mais baixas do que as que continham apenas uma ou nenhuma cópia do alelo/locus. Desta forma, os níveis elevados de resistência/tolerância ao ToSRV também apresentaram uma estreita ligação com o locus *Ty-1*, indicando que essa região do genoma do tomateiro apresenta um fator ou grupamento de fatores genéticos que controlam um amplo espectro de tolerância/resistência contra distintas espécies do gênero *Begomovirus*. Os resultados também indicam aos programas de melhoramento que para obter híbridos com uma melhor expressão fenotípica da tolerância/resistência ao ToSRV deve-se, sempre que possível, utilizar as duas linhagens parentais com o alelo dominante *Ty-1* em homozigose. No entanto, na maioria dos acessos contendo o locus *Ty-1*, esta região se mostrou ligada em repulsão com o locus *Mi* que controla resistência a espécies de *Meloidogyne*, outro importante grupo de patógenos do tomateiro (Zamir *et al.*, 1994; De Castro *et al.*, 2007). Os solos tropicais e subtropicais são frequentemente infestados com espécies de *Meloidogyne* e o emprego de híbridos homozigotos para o *Ty-1* poderá resultar em perdas devido à infecção por esses patógenos do solo (Boiteux *et al.*, 2012). Portanto, se faz necessário um esforço no sentido de tentar “quebrar” essa ligação em repulsão entre o locus *Ty-1* e o gene *Mi*, empregando para tal, populações segregantes com um número elevado de indivíduos para permitir a ocorrência dos raros eventos de recombinação entre essas duas regiões genômicas e associação com o monitoramento (via marcadores moleculares codominantes) dessas populações para poder identificar e selecionar os indivíduos que apresentem esses eventos de recombinação. Trabalhos visando estimar o efeito da dosagem do locus *Ty-1* e sua potencial interferência na

replicação viral (acumulação/título viral) em tecidos foliares estão em andamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANBINDER, I.; REUVENI, M.; AZARI, R.; PARAN, I.; NAHON, S.; SHLOMO, H.; CHEN, L.; LAPIDOT, M.; LEVIN, I. 2009. Molecular dissection of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 519–530.
- BANERJEE, M.K.; KALLOO, G. 1987. Inheritance of tomato leaf curl virus resistance in *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. *Euphytica* 36: 581–584.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32–38.
- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA, V.R.; SILVA, C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO, L.B. 2007a. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. *Horticultura Brasileira* 25: 20–23.
- BOITEUX, L.S.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. 2007b. Reação de acessos de tomateiro portando o gene *Ty-2* (introgredido de *Solanum habrochaites* f. *glabratum*) a um isolado de begomovírus de genoma bipartido. *Horticultura Brasileira* 25: S97.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; VIEIRA, J.V.; Pereira-Carvalho, R.C. 2012. Breeding for Resistance to Viral Diseases. In: Fritsche-Neto R.; Borém A. (Org.). *Plant Breeding for Biotic Stress Resistance*. 1ª ed. Berlin–Heidelberg: Springer–Verlag, v. 1, p. 57–79.
- BIAN, X.Y.; THOMAS, M.R.; RASHEED, M.S.; SAEED, M.; HANSON, P.; DE BARRO, P.J.; REZAIAN, M.A. 2007. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology* 97: 930–937.
- DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M.; DINSDALE, A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annual Review of Entomology* 56: 1–19.
- DE CASTRO, A.P.; BLANCA, J.M.; DÍEZ, M.J.; VINÁLS, F.N. 2007. Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *European Journal of Plant Pathology* 117: 347–356.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; DE ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251–258.
- FERNANDES, N.A.N. 2010. Variabilidade genômica e geográfica de espécies de begomovírus em tomateiro e em dois gêneros de plantas daninhas no Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 118 pp.
- GARCÍA-CANO, E.; RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. 2008. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology* 98: 618–627.
- GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; BOITEUX, L.S. 2005a. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* 23: 815–818.

- GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA, F.M.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. 2005b. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143: 27–33.
- GONZÁLEZ-CABEZUELO, J.M.; CAPEL, J.; ABDAD, J.; TOMÁS, D.M.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E.; LOZANO, R. 2012. Genotyping selection for resistance against *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) conferred by *Ty-1* and *Ty-3* genes in tomato. *Molecular Breeding* 30: 1131–1142.
- HANSON, P.M.; BERNACCHI, D.; GREEN, S.; TANKSLEY, S.D.; MUNIYAPPA, V.; PADMAJA, A.S.; MEI, C.H.; KUO, G.; FANG, D.; TZU, C.J. 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with *Tomato yellow leaf curl virus* resistance in a cultivated tomato line. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 15–20.
- HANSON, P.; GREEN, S.K.; KUO, G. 2006. *Ty-2*, a gene in chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetics Cooperative Report* 56: 17–18.
- HARRISON, B.D. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23: 55–82.
- HOROWITZ, R.; DENHOLM, I.; MORIN, S. 2007. Resistance to insecticides in the TYLCV vector, *Bemisia tabaci*. In: *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease* (Czosnek H., ed). The Netherlands: Springer, pp. 305–325.
- HUTTON, S.F.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2012. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4. *HortScience* 47: 324–327.
- JI, Y.; SCHUSTER, D.J.; SCOTT, J.W. 2007. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20: 271–284.
- JI, Y.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. 2009. Molecular mapping of *Ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134: 281–288.
- KADIRVEL, P.; DE LA PENA, R.; SCHAFLEITNER, R.; HUANG, S.; GEETHANJALI, S.; KENYON, L.; TSAI, W.; HANSON, P. 2012. Mapping of QTLs in tomato line FLA456 associated with resistance to a virus causing tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica*: doi 10.1007/s10681-012-0848-0
- LAPIDOT, M.; BEN-JOSEPH, R.; COHEN, L. 2006. Development of a scale for evaluation of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance level in tomato plants. *Phytopathology* 96: 1404–1408.
- LATERROT, H. 1993. Present state of the genetic control of *Tomato yellow leaf curl virus* and of the EEC-supported breeding programme. In: *Eucarpia Tomato-93*. Stamova L (Ed.). Proceedings XII the Eucarpia Meeting on Tomato Genetics and Breeding, Bulgária. pp. 19–24.
- MATOS, E.S.; SIQUEIRA, W.J.; LOURENÇÃO, A.L.; MELO, A.M.T.; SAWAZAKI, H.E.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; COLARICCIO, A. 2003. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 28: 159–165.
- MAXWELL, D.P., MARTIN, C.; SALUS, M.S.; MONTES, L.; MEJÍA, L. 2006. Tagging begomovirus resistance genes. www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers.
- MELO, P.C.T.; MELO, A.M.T.; BOITEUX, L.S. 2009. Overview and perspectives of tomato breeding for fresh market adapted to mild tropical climates of Brazil. *Acta Horticulturae* 821: 55–62.

- MICHELSON, I.; ZAMIR, D.; CZOSNEK, H. 1994. Accumulation and translocation of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology* 84: 928–933.
- NIZIO, D.A.C.; MALUF, W.R.; FIGUEIRA, A.R.; NOGUEIRA, D.W.; SILVA, V.F.; NETO, A.C. 2008. Caracterização de genótipos de tomateiro resistentes a begomovírus por marcador molecular codominante ligado ao gene *Ty-1*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 1699–1705.
- PEREIRA-CARVALHO, R.C.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; DÍAZ-PENDÓN, J.A.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; CHARCHAR, J.M.; RESENDE, R.O. 2010. Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions. *Plant Disease* 94: 179–185.
- RIBEIRO, S.G.; MELO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W.; FARIA, J.C. 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19: 330.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVIĆIUS, L.P.; DE ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281–295.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSEL, D.R.; MAXWELL, D. 1993. Use of degenerated primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340–347.
- SANTANA, F.M.; RIBEIRO, S.G.; MOITA, A.W.; MOREIRA-JUNIOR, D.J.; GIORDANO, L.B. 2001. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122: 45–51.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. 2008. Introdução à Estatística Matemática. In: Schyster, I.; Cruz, C.D. (org.). *Estatística Genômica – Aplicada a Populações Derivadas de Cruzamentos Controlados*. 2a ed. UFV, Viçosa-MG. p. 65–106.
- THE TOMATO GENOME CONSORTIUM 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; FAUQUET, C.M. 2005 Geminiviruses and RNA silencing. *Trends in Plant Sciences* 10: 144–151.
- VERLAAN, M.G.; SZINAY, D.; HUTTON, S.F.; DE JONG, H.; KORMELINK, R.; VISSER, R.G.F.; SCOTT, J.W.; BAI, Y. 2011. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *The Plant Journal* 68: 1093–1103.
- VERLAAN, M. G.; HUTTON, S. F.; IBRAHEM, R. M.; KORMELINK, R.; VISSER, R. G.; SCOTT, J. W.; EDWARDS JD; BAI, Y. 2013. The *Tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genetics* 9 (3): e1003399.
- 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. 1994. Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 141–146.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MARCADORES RAPD/SCAR PARA MONITORAR DOIS EVENTOS DE INTROGRESSÃO DO LOCUS *Ty-1* (RESISTÊNCIA A BEGOMOVÍRUS) DE *Solanum chilense* EM TOMATEIRO.

Daniela D.X. Ferro¹; Maria Esther N. Fonseca² & Leonardo S. Boiteux^{1,2}

¹Universidade de Brasília (UnB), Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Biologia, 70910-900 Brasília (DF), Brasil.

²Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Hortaliças), CP 218, 70359-970 Brasília-DF, Brasil.

RESUMO

Desenvolvimento de novos marcadores RAPD/SCAR para monitorar dois eventos de introgressão do locus *Ty-1* (resistência a begomovírus) de *Solanum chilense* em tomateiro – O locus *Ty-1*, introgridido de acessos da espécie selvagem *S. chilense*, tem sido o mais importante fator de resistência/tolerância a espécies de *Begomovirus* empregado no melhoramento genético do tomateiro (*Solanum lycopersicum*). O sistema RAPD (“*Randomly Amplified Polymorphic DNA*”) tem sido amplamente utilizado para monitorar a incorporação de fatores de resistência a diferentes patógenos do tomateiro. O objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores RAPD e/ou SCAR (“*Sequence Characterized Amplified Region*”) robustos e com mais ampla utilização em sistemas de seleção assistida de diferentes eventos de introgressão do locus *Ty-1*. Foram utilizadas duas populações F₂ segregantes para uma região do cromossomo 6 do tomateiro englobando diferentes fatores de resistência a patógenos. A população #1 foi derivada do cruzamento entre duas linhagens isogênicas (LAM 144-R x LAM 144-S), contendo apenas marcadores moleculares para o locus *Ty-1*. A população #2 foi derivada do cruzamento de duas linhagens isogênicas (LAM 162-Mi x LAM 162-Ty) e segrega para os marcadores associados com dois loci de resistência a begomovírus (*Ty-1* e *Ty-3*) e também para o gene *Mi* (resistência a *Meloidogyne* introgridida de *S. peruvianum*). As quatro linhagens parentais foram avaliadas inicialmente com uma coleção de 520 *primers* RAPD. Seis *primers* foram selecionados gerando polimorfismos associados com o locus *Ty-1* exclusivamente para população #1; quatorze foram exclusivamente polimórficos na população #2 e nove detectaram polimorfismos nas duas populações. Esses padrões de polimorfismos diferenciados indicaram que as linhagens resistentes são derivadas de dois eventos distintos de introgressão do locus *Ty-1* (muito provavelmente dos acessos *S. chilense* ‘LA-1969’ e ‘LA-2779’). A validação do subconjunto de *primers* RAPD polimórficos para a população #1 foi inicialmente conduzida com uma amostra de 96 indivíduos inoculados com *Tomato severe rugose virus*. Dez amplicons RAPD polimórficos e estáveis foram purificados e sequenciados. Um marcador SCAR codominante (heteroduplex) foi gerado a partir do marcador OPC-19₈₀₀. A análise de sequência e sua ancoragem no genoma do tomateiro confirmaram que esse marcador está localizado na mesma região do locus *Ty-1* no cromossomo 6, recomendando o seu uso em sistemas de seleção assistida.

Palavras-chaves: *Begomovirus*, marcadores, melhoramento, RAPD, SCAR, resistência.

ABSTRACT

Development of novel RAPD/SCAR markers to monitor two introgression events of the locus *Ty-1* (begomovirus resistance) from *Solanum chilense* into cultivated tomato –

Thus far, *Ty-1* (introgressed from the wild species *S. chilense*) is the most important *Begomovirus* resistance/tolerance locus for tomato (*Solanum lycopersicum*) breeding. RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) marker system has been employed to monitor the incorporation of *Ty-1* and other genetic factors controlling resistance to many tomato pathogens. The main objective of the present work was to identify novel and robust RAPD and/or SCAR (“Sequence Characterized Amplified Region”) markers linked to *Ty-1* that would be suitable for employment in distinct assisted-selection programs. Two segregating F₂ were employed for mapping the tomato chromosome 6 region encompassing *Ty-1* and other disease resistance factors. The population #1 was derived from a cross between two near isogenic lines (LAM 144-R x LAM 144-S), having only molecular markers associated with the *Ty-1* locus. The population #2 was derived from a cross between two near isogenic lines (LAM 162-Mi x LAM 162-Ty) that differ to markers associated with two begomovirus resistance loci (*Ty-1* and *Ty-3*) as well as for the *Mi* (*Meloidogyne* resistance) gene. The four parental lines were initially evaluated with a panel of 520 RAPD primers. Six primers were selected due to the presence of polymorphic amplicons associated with the locus *Ty-1* exclusively for population #1; fourteen primers were able to detect polymorphic amplicons exclusively in population #2 and nine were able to detect polymorphic markers in both populations. These observed polymorphic patterns indicated that the two lines are derived from distinct introgression events (more likely from the *S. chilense* accessions ‘LA-1969’ and ‘LA-2779’). A subgroup of RAPD markers was validated using a sample of 96 individuals of the population #1 after inoculation with *Tomato severe rugose virus*. Ten stable RAPD amplicons were gel-purified and sequenced aiming to generate SCAR markers. One SCAR amplicon (derived from RAPD OPC-19₈₀₀) generated a marker with a peculiar heteroduplex and codominant pattern. The sequence analysis of SCAR OPC-19₈₀₀ allowed us to anchor this marker in a physical region corresponding to that where *Ty-1* locus resides on tomato chromosome 6. This new collection of RAPD/SCAR markers might become important tools for the marker-assisted selection for monitoring the incorporation of the *Ty-1* locus in a wide range of tomato accessions.

Key-words: *Begomovirus*, molecular markers, assisted-selection breeding, resistance.

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a principal hortaliça produzida no Brasil, sendo que os Estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais destacam-se como as principais regiões produtoras do país (Melo *et al.*, 2009). Muitas doenças são responsáveis por severas perdas na produção, porém, recentemente, as begomoviroses (= geminiviroses) têm se destacado por causar elevados prejuízos econômicos aos produtores de tomate em diversas regiões do mundo (Navas-Castillo *et al.*, 2011). O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) é caracterizado por possuir genoma de DNA de fita simples, encapsidado em partículas com morfologia geminada, podendo possuir genoma monopartido (somente composto pelo componente DNA-A) ou bipartido (DNA-A e DNA-B). A replicação viral ocorre no núcleo da célula hospedeira através do mecanismo de círculo rolante a partir de um intermediário de DNA dupla fita (Fauquet *et al.*, 2008). Os begomovírus são transmitidos por um complexo de espécies crípticas e biótipos de *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae) (de Barro *et al.*, 2011). Os principais sintomas induzidos pelos begomovírus em tomateiro são enrolamento da folha, epinastia, mosaico-dourado, rugosidade, clorose das nervuras e também clorose internerval, mosqueado e nanismo que resultam em redução da floração, redução no ‘pegamento’ de frutos, paralisação no crescimento e consequente perda na produção (Zhou *et al.*, 2008). Perdas de produção superiores a 60% têm sido registradas em variedades suscetíveis especialmente se a infecção das plantas ocorrer nos estádios iniciais de desenvolvimento (Giordano *et al.*, 2005a).

O controle químico dos begomovírus é difícil mesmo em pressões populacionais moderadas do vetor uma vez que a transmissão pela mosca-branca é muito eficiente (Boiteux *et al.*, 2012). A adoção combinada de algumas estratégias de controle cultural permite uma convivência com as geminiviroses, mas não garante proteção completa contra os danos causados por esse grupo de patógenos. A resistência genética tem sido um dos poucos

métodos eficazes de controle de doenças virais em plantas. Desta forma, vários trabalhos de melhoramento genético têm sido conduzidos com a finalidade de disponibilizar fatores de resistência aos begomovírus em todos os segmentos varietais de tomate (Boiteux *et al.*, 2012).

Diversas fontes de resistência a begomovírus foram identificadas em espécies selvagens do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*). O locus *Ty-2* foi introgridido a partir de um acesso de *S. habrochaites* (Hanson *et al.*, 2006) se mostra com relativa eficiência contra isolados brasileiros (Boiteux *et al.*, 2007b). O locus *Ty-3* foi derivado do acesso *S. chilense* ‘LA-2779’ e confere alto nível de resistência contra a espécie de genoma monopartido – *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e resistência intermediária a isolados de espécies de genoma bipartido presentes na Flórida (Ji *et al.*, 2007). O locus *Ty-4*, derivado de acessos de *S. chilense* (Ji *et al.*, 2009) e o locus dominante *Ty-5*, derivado de acessos de *S. peruvianum* (Anbinder *et al.*, 2009) têm mostrado boa eficiência contra isolados norte-americanos e israelenses de TYLCV. A primeira fonte de resistência monogênica recessiva a begomovírus (*tcm-1*) foi caracterizada em linhagens derivadas do híbrido comercial *S. lycopersicum* ‘Tyking’ (Giordano *et al.*, 2005b; Garcia-Cano *et al.*, 2008). Outros genes recessivos (denominados de *tgr-1* e *ty-5*) foram também caracterizados em linhagens derivadas de cruzamentos múltiplos envolvendo acessos de *S. chilense* e o também do híbrido comercial ‘Tyking’ (Bian *et al.*, 2007; Hutton *et al.*, 2012). O locus *ty-5* foi mapeado no cromossomo 4 do tomateiro e controla resistência contra isolados de TYLCV da Flórida, Estados Unidos (Hutton *et al.*, 2012).

No entanto, o locus *Ty-1* tem sido a fonte de resistência mais estudada e utilizada no desenvolvimento de cultivares de tomateiro. Esse locus foi inicialmente introgridido em tomateiro através de cruzamento interespecífico com o acesso *S. chilense* ‘LA-1969’ (Zakay *et al.*, 1991). Linhagens e híbridos contendo o locus *Ty-1* têm se mostrado efetivos contra diferentes isolados de diferentes espécies de *Begomovirus* em diferentes continentes (Zamir *et*

al., 1994; Boiteux *et al.*, 2007a). Uma característica interessante é que o locus *Ty-1* e muitos outros genes de resistência a doença de importância para melhoramento genético têm sido mapeados no cromossomo 6, dentre eles destacam-se o genes *Mi* (introgridido de *S. peruvianum*) que controla resistência a algumas espécies de *Meloidogyne* (Zamir *et al.*, 1994). Em alguns acessos foi observado que o genes *Mi* e *Ty-1* estão ligados em repulsão (de Castro *et al.*, 2007), dificultando desta forma a obtenção de linhagens endogâmicas resistentes a esses dois grupos de patógenos (Messeguer *et al.*, 1991; Zamir *et al.*, 1994; Pereira-Carvalho *et al.*, 2010). Análises mais recentes empregando “*Fluorescence in situ hybridization*” (FISH) e progênies recombinantes para o locus *Ty-1* indicaram seu posicionamento em um segmento do genoma onde o locus *Ty-3* também foi mapeado, indicando que os dois fatores de resistência podem estar fortemente ligados ou mesmo representar variantes alélicas de um mesmo gene (Verlaan *et al.*, 2011). Essa informação foi posteriormente confirmada e um gene codificador de uma polimerase RNA-dependente de RNA da classe DFDGD foi determinado como sendo o fator de resistência associado com o locus *Ty-1* (Verlann *et al.*, 2013). Mais recentemente, novos fatores de resistência a TYLCV foram caracterizados nos acessos *S. chilense* ‘LA-1932’, ‘LA-1960’ e ‘LA-1971’. Todos os loci de resistência de *S. chilense* foram também mapeados na região genômica englobando os loci *Ty-1/Ty-3* (de Castro *et al.*, 2012).

No melhoramento genético convencional para resistência a doenças, são realizados vários cruzamentos e avanços de gerações que são acompanhados de fenotipagem dos indivíduos por meio de inoculações controladas. Essas tarefas demandam muito tempo, recursos e mão de obra (Boiteux *et al.*, 2012). Sistemas de seleção assistida por marcadores moleculares fortemente ligados a genes de resistência a doenças têm sido bastante explorados nos modernos programas de melhoramento genético (Collard *et al.*, 2005). O uso de marcadores permite acelerar o processo de identificação de indivíduos recombinantes

desejados, aumentando a eficiência de todo o processo (Collard *et al.*, 2005). De fato, sistemas de seleção assistida com marcadores funcionais e codominantes têm reduzido, de maneira considerável, o tempo requerido para o desenvolvimento de linhagens puras resistentes, suprimindo o uso de inoculações controladas e permitindo separar indivíduos homozigotos e heterozigotos sem avaliações de progênie (Silva & Santos, 2001).

Diferentes sistemas de marcadores moleculares têm sido utilizados no monitoramento da incorporação de fatores genéticos ligados às características de interesse para o melhoramento genético vegetal (Collard *et al.*, 2005). Entre eles destacam-se os sistemas de marcadores RAPD (“*Randomly Amplified Polymorphic DNA*”) (Williams *et al.*, 1990) AP-PCR (“*Arbitrarily Polymerase Chain Reaction*”) (Welsh & McClelland, 1990) e DAF (“*DNA Amplification Fingerprinting*”) (Caetano-Anóles *et al.*, 1991). Embora o sistema RAPD tenha se tornado o mais popular, todas essas técnicas são equivalentes e consistem, basicamente, de uma variação do protocolo PCR usando um único oligonucleotídeo iniciador (= *primer*) de sequência arbitrária (i.e. construída aleatoriamente) (Collard *et al.*, 2005). Essa é uma técnica simples e robusta que permite a amplificação seletiva de segmentos de DNA localizados em diferentes regiões tanto do genoma nuclear quando de organelas. O sistema RAPD pode discriminar um número elevado de amplicons por *primer* que, quando polimórficos, podem ser utilizados como potenciais marcadores moleculares (Williams *et al.*, 1990).

O sistema RAPD tornou-se uma ferramenta de grande utilização em estudos genéticos, propiciando um grande avanço na área de marcadores uma vez que ele promove uma ampla cobertura genômica, aumentando as chances de identificar polimorfismos em regiões próximas de genes de interesse (Gotmisky *et al.*, 1999). A análise através de RAPD tem sido empregada em estudos de caracterização da variabilidade genética em espécies de interesse econômico, por ser uma técnica simples, barata e rápida (Williams *et al.*, 1990).

Normalmente, os polimorfismos produzidos por esta técnica aparecem sob a forma de presença/ausência de amplicons. No entanto, polimorfismos de intensidade podem eventualmente ocorrer e sua origem/natureza molecular é variável. Evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (“mutações de ponto”) são suficientes para impedir a complementariedade do primer com o sítio de iniciação (= *priming site*) e assim evitar uma perfeita amplificação de um segmento (Williams *et al.*, 1990). Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer (Brauner *et al.*, 1992).

Uma das desvantagens dos marcadores RAPD é que estes são, majoritariamente, de caráter dominante (não permitindo a distinção entre genótipos homozigotos e heterozigotos), ou seja, não amplificando alelos alternativos de um dado locus genômico. Além disso, marcadores gerados pela técnica RAPD apresentam, em geral, baixos níveis de repetibilidade e baixa consistência da detecção quando avaliados em diferentes laboratórios e/ou condições experimentais (Paran & Michelmore, 1993). Como solução desse problema, os marcadores RAPD podem ser convertidos em marcadores SCAR (“*Sequence Characterized Amplified Region*”). No desenvolvimento de marcadores SCAR, os amplicons RAPD são clonados e sequenciados. A partir da informação da sequência são desenhados *primers* de maior tamanho que são, na maioria das vezes, mais estáveis e com padrões específicos de amplificação do DNA genômico englobando o locus de interesse (Paran & Michelmore, 1993). Em algumas situações os polimorfismos antes existentes no sistema RAPD podem também ser perdidos após a tentativa de conversão para marcador SCAR. Como alternativa, pode-se detectar polimorfismos de bases únicas (*Single nucleotide polymorphisms* – SNPs) na região interna flanqueada pelos *primers* SCAR e um novo sistema de detecção desses polimorfismos pode ser desenvolvido (Vignal *et al.*, 2002). Por outro lado, a amplificação dos marcadores SCAR

pode também revelar (em frequências relativamente altas) os alelos alternativos de um dado marcador, sendo, portanto, convertidos em marcadores codominantes (Paran & Michelmore, 1993). Essa característica de potencialmente gerar marcadores codominantes é o grande atrativo da utilização do sistema SCAR.

No tomateiro e em diversas espécies do gênero *Solanum* (Secção *Lycopersicon*), os sistemas de marcadores RAPD e SCAR têm sido empregados na construção de diversos mapas genômicos e tem sido amplamente utilizados em muitas plataformas de melhoramento assistido por marcadores (MAS), incluindo o processo de monitoramento de diversas regiões genômicas contendo genes de resistência a doenças (Chunwongse *et al.*, 1994; Van-der-Beek *et al.*, 1994; Ganai *et al.*, 1995; Stevens *et al.*, 1995; Yaghoobi *et al.*, 1995; Chague *et al.*, 1996; Pillen *et al.*, 1996; Doganlar *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2002), incluindo resistência a espécies de begomovírus (Zamir *et al.*, 1994; Chague *et al.*, 1997; De Castro *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). No entanto, muitos dos marcadores relatados na literatura são pouco operacionais para uso em larga escala. Além disso, alguns não apresentam a característica de codominância e funcionam somente em algumas populações segregantes.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar novos marcadores RAPD e/ou SCAR ligados à região genômica contendo os loci *Ty-1* e/ou *Ty-3*. Essa busca tem por objetivo identificar os marcadores que sejam mais estáveis, robustos e passíveis de serem usados em diferentes eventos de introgressão e em diferentes grupos varietais, sendo, desta forma, mais amplamente recomendados para uso em sistemas de seleção assistida para esses importantes fatores de resistência genética aos begomovírus do tomateiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Características das linhagens isogênicas, desenvolvimento e avaliação para resistência ao *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) de duas populações segregantes

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Melhoramento Genético de Hortaliças e de Análise Genômica de Hortaliças, sediado em Brasília-DF. Foram utilizadas duas populações F₂ segregantes para fatores de resistência/tolerância a begomovírus presentes no cromossomo 6 do tomateiro. A população #1 foi resultante do cruzamento entre duas linhagens isogênicas (LAM 144-R x LAM 144-S), contrastando apenas para resposta a begomovírus e a presença/ausência de marcadores moleculares ligados com o locus *Ty-1*. A população #2 foi derivada do cruzamento de duas linhagens isogênicas (LAM 162-Mi x LAM 162-Ty) que contrastam para os marcadores associados com dois loci de resistência a begomovírus (*Ty-1* e *Ty-3*) e também para o gene *Mi* (introgridido da espécie selvagem *S. peruvianum*). Todos esses fatores de resistência/tolerância estão em estreita ligação no cromossomo 6. Essas duas populações são derivadas da autofecundação seriada de dois híbridos comerciais, não sendo disponível a informação sobre qual fonte de resistência/tolerância a begomovírus foi originalmente empregada nos experimentos de introgressão.

A semeadura das duas populações foi feita em bandejas de isopor com 200 células, utilizando um substrato composto por vermiculita expandida, casca de *Pinus* e casca de arroz carbonizada e suplementado com fertilizantes. Colocou-se uma ou duas sementes por célula, recobrando-as em seguida com substrato peneirado. A inoculação foi feita com o auxílio de moscas-brancas virulíferas, infectadas com um isolado de ToSRV, aos 20 DAS (dias após semeadura) e aos 30 DAS foi feito o transplântio para vasos com capacidade de 5 litros contendo solo autoclavado devidamente adubado e com pH corrigido. Foram feitas duas

avaliações para a população #1 [uma aos 44 dias após a inoculação (DAI) e outra aos 87 DAI]. Para a população #2, as avaliações serão conduzidas preferencialmente nas mesmas idades. Os fenótipos das plantas inoculadas foram avaliados de acordo com a escala de notas adaptada de Lapidot *et al.* (2006) onde: nota 0= ausência de sintomas; nota 1= amarelecimento suave restrito às folhas apicais; nota 2= amarelecimento mais acentuado e enrolamento dos folíolos; nota 3= muitas folhas com amarelecimento, enrolamento, alguma redução no tamanho, contudo as plantas continuam se desenvolvendo; nota 4= amarelecimento e enrolamento foliar severos e paralisação do crescimento/nanismo. Para confirmação da pureza do inoculo, amostras de DNA total de tecidos foliares de plantas inoculadas foram extraídas e um segmento do componente do DNA-A do vírus foi amplificado via PCR utilizando os *primers* degenerados 'PAL1v1978' (5'-GCA-TCT-GCA-GGC-CCA-ACT-YGT-CTT-TYC-CNG-T-3') e 'PAR1c496' (5'-AAT-ACT-GCA-GGG-CTT-YCT-RTA-CAT-RGG- 3'), que têm sido empregados para detecção universal de espécies do gênero *Begomovirus* (Rojas *et al.*, 1993). Uma alíquota do produto de PCR foi diretamente sequenciada usando o kit Big-DyeIII em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) do laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças. A análise das sequências foi feita empregando o algoritmo BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e as sequências foram alinhadas pelo método Clustal W dentro do aplicativo LaserGene (Madison, WI).

2.2. Extração de DNA genômico de linhagens parentais e indivíduos das populações segregantes.

O DNA total foi extraído individualmente de cada planta das linhagens parentais e de indivíduos das populações segregantes de acordo com a metodologia de CTAB 2X com algumas modificações (Boiteux *et al.*, 1999). Em cada tubo foram colocadas seis esferas

metálicas, juntamente com pequena quantidade homogênea das amostras de folhas. Acrescentou-se aos tubos 250 µL de CTAB e as amostras foram trituradas no aparelho Precellys[®]24 (Bertin Technologies). Após 30 segundos a 5000 rpm, as amostras foram retiradas e colocadas em banho-maria a 65°C durante 10 minutos; acrescentou-se, após esse tempo, 750 µL de clorofil em cada tubo e agitou-os no vortex por aproximadamente 30 segundos. As amostras foram então centrifugadas por 9000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente, os tubos foram retirados da centrífuga e 600 µL do sobrenadante foram retirados e colocados em novos tubos de micro-centrífuga. Foram acrescentados 300 µL de isopropanol gelado e para homogeneizar, os tubos foram suavemente agitados de forma manual e posteriormente centrifugados a 13000 rpm durante 13 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o ‘pellet’ lavado com álcool 70%, de forma cuidadosa, para evitar a sua ressuspensão. Os tubos foram então colocados na estufa a 37°C por 20 minutos, depois se acrescentou 100 µL de TE+RNAse e colocou-se os tubos na geladeira. No outro dia, as amostras foram agitadas no vortex e os DNAs então extraídos foram guardados no freezer. As quantificações de DNA foram feitas visualmente através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (1,5 µL/100 mL de gel), comparando com amostras de concentração conhecida de DNA λ (20 a 400 ng).

2.3. Genotipagem das linhagens parentais da população #1 para marcadores ligados ao loci *Ty-1*.

A genotipagem para o locus *Ty-1* dos parentais da população #1 (‘LAM 144-R’ e ‘LAM 144-S’) foi feita inicialmente com marcadores previamente descritos em ligação com essa região genômica, visando possibilitar a diferenciação e visualização do genótipo homocigoto resistente, heterocigoto suscetível e homocigoto suscetível de cada indivíduo da população. Essa análise serviu para comparação do padrão de polimorfismo gerado pelos

primers RAPD com ausência/presença do alelo *Ty-1*. A genotipagem inicial foi feita utilizando o par de *primers* UW Ty_1 Forward (5'ATA-AGC-ATT-TCA-TGT-CAG-ATG-TCT-A 3') e UW Ty_1 Reverse (5' CTA-GAT-CCT-GGA-TGA-CTT-CAA-TAG-C 3'), capazes de detectar amplicons polimórficos entre o locus de resistência (*Ty-1*) e o locus de suscetibilidade (*ty-1*) após clivagem com a enzima de restrição *Taq-1* (Maxwell *et al.*, 2006).

O mix da reação constituiu de 1,25 μ L de Tampão 10X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 1,25 μ L de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,5 μ L de cada primer, 0,75 μ L de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,2 μ L da enzima *Taq* Polimerase (5 U/ μ L, Invitrogen), 5,05 μ L de água Milli-Q e 3 μ L de DNA, totalizando um mix de 12,5 μ L. As amplificações foram efetuadas em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 programado para 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído pelos parâmetros a seguir: etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 35 ciclos – desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto – e finalização com extensão a 72°C durante 10 minutos. A composição do mix da enzima de restrição foi a seguinte: 0,9 μ L de água Milli-Q, 1,5 μ L de Tampão 10X da enzima de restrição *Taq-1* (10U/ μ L) e 0,1 μ L da enzima de restrição *Taq-1*, totalizando um volume final de 2,5 μ L. A clivagem enzimática foi conduzida por 4 horas a 65°C.

2.4. Genotipagem das linhagens parentais da população #2 para marcadores ligados ao locus *Ty-3*.

Para identificação do alelo *Ty-3* foram utilizados os *primers* específicos (Salus & Maxwell, 2007; Ji *et al.*, 2007) denominados FLUW-25F (5'CAA-GTG-TGC-ATA-TAC-TTC-ATA-(T/G)-TCA-CC 3') e o seu primer reverso a FLUW-25R (5' CCA-TAT-ATA-ACC-TCT-GTT-TCT-ATT-TCG-AC 3'). Esse marcador foi escolhido devido a estreita ligação gênica com a mesma região do genoma de *Ty-1*, devido a sua segregação na

população #2 e devido a sua facilidade metodológica (é um marcador codominante derivado diretamente de um produto de PCR). Para esses ensaios, o DNA total extraído dos parentais da população #2 foi usado como molde ('LAM 162-Mi' e 'LAM162-Ty'). O mix da reação e as condições de amplificação foram as mesmas utilizadas anteriormente, descritos no tópico 2.3.

2.5. Avaliação das linhagens parentais das populações #1 e #2 com uma coleção de primers RAPD.

Um total de 520 *primers* RAPD (série Operon OPA-01 até OPZ-20, Operon Technologies, Alameda, Califórnia, EUA) foi avaliado na busca por polimorfismos entre indivíduos contrastantes quanto à presença do alelo *Ty-1*, nos parentais da população #1 (LAM 144R x LAM 144S) e da População#2 (LAM 162-Mi x LAM162-Ty). As amostras de DNA quantificadas foram diluídas para uma concentração de 40 ng/μL e utilizadas nas reações de RAPD. Todas as reações foram feitas no volume total de 12,5 μL, sendo 1,25 μL de Tampão 10X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen); 0,50 μL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen, preparado da seguinte maneira: 25 μL de cada base dATP, dTTP, dGTP e dCTP, totalizando 100 μL + 900 μL de TRIS 0,01M); 2,0 μL de cada primer RAPD; 0,60 μL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 0,2 μL da enzima *Taq* Polimerase (5 U/μL, Invitrogen); 5,95 μL de água Milli-Q e 2 μL de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 programado para 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído pelos parâmetros a seguir: etapa inicial de desnaturação a 94°C, durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos - desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 36°C por 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos – e finalização com extensão a 68°C por 10 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), corados por brometo de etídeo. A eletroforese foi feita em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), a 150 V, por um período de aproximadamente 3 horas. O preparo

do TBE foi feito adicionando 108 g de TRIS/1L de água destilada e 55 g de ácido bórico, depois de dissolvido acrescentaram-se 40 mL de EDTA a 0,5 M. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, tendo-se utilizado o marcador 1 Kb Plus DNALadder[®] (Invitrogen) para análise dos produtos obtidos.

2.6. Validação com uma amostra da população #1 de marcadores RAPD polimórficos entre os parentais

Para a população #1, a seleção de marcadores potencialmente ligados ao locus *Ty-1* foi feita em três etapas. Na primeira etapa, fez-se uma seleção dos *primers* utilizando indivíduos contrastantes homozigotos resistentes (*Ty-1/Ty-1*) e homozigotos suscetíveis (*ty-1/ty-1*). Na segunda etapa, os *primers* capazes de gerar polimorfismo foram testados em 12 indivíduos contrastantes quanto ao locus dominante *Ty-1* (seis com presença e seis com ausência) e na última etapa os *primers* capazes de manter o polimorfismo foram validados com uma amostra de 96 indivíduos da população F₂.

2.7. Validação com uma amostra da população #2 de marcadores RAPD polimórficos entre os parentais.

Na população #2, a seleção foi feita até a segunda etapa, utilizando apenas os parentais. A população F₂ se encontra semeada e em processo de avaliação.

2.8. Purificação de amplicons RAPD polimórficos para a população #1.

Os melhores marcadores RAPD associados ao *Ty-1*, ou seja, mais estáveis e em estreita ligação com o locus de interesse, tiveram suas bandas polimórficas extraídas do gel de agarose e purificadas. Para a purificação das bandas foi utilizado o *Kit Invitrogen PureLinkTM (Quick Gel Extraction Kit)*, seguindo as recomendações do fabricante.

2.9. Clonagem dos amplicons RAPD polimórficos para a população #1.

Para a clonagem de amplicons polimórficos utilizou-se o protocolo *pGEM[®]-T Easy Vector Systems*, com algumas modificações. A ligação foi feita adicionando a tubos Eppendorf: 0,5 µL do vetor pGEM; 5 µL do tampão; 1 µL ligase; 0,5 µL de água Milli-Q e 3 µL do produto de PCR (bandas purificadas), totalizando 10 µL de ligação. As reações foram incubadas a 4°C overnight. Após esse período foram adicionados 50 µL de células competentes (JM 109 *High Efficiency Competent Cells*) a 2 µL da reação de ligação, incubando-os em gelo por 20 minutos. O choque térmico foi dado retirando os tubos do gelo e colocando em banho-maria a exatamente 42°C por 45 segundos. Imediatamente os tubos foram retirados e acondicionados em gelo por 2 minutos. Adicionou-se 950 µL de meio LB líquido. As transformações foram incubadas (durante 1 hora e 30 minutos a 37°C) em condições de constante agitação. Plaqueou-se 100 µL de cada transformação em placas de Petri contendo meio LB + ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas. Fez-se então a reação de PCR de cada colônia para confirmação e seleção das bactérias que haviam sido transformadas. Na próxima etapa foi feito MiniPrep das colônias selecionadas, para então serem sequenciadas.

2.10. Sequenciamento dos amplicons clonados

O sequenciamento das bandas foi realizado em um sequenciador ABI PRISM 3100 da Embrapa Hortaliças (CNPq), utilizando o Kit ABI Prism BigDye version 3.1 (Applied Biosystems do Brasil) e os iniciadores de síntese do vetor M13 (M13 “reverse” e “Forward”). A análise da qualidade das sequências, remoção dos segmentos de baixa qualidade (Allex, 1999) e a obtenção das sequências consenso foram realizadas usando o programa SeqMan (Lasergene, Madison, WI). As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do SGN – Sol Genomics Network, através no programa BLASTn (nucleotide to

nucleotide)/SGN Tomato Combined, na página eletrônica do SGN (www.solgenomics.net/tools/blast/index.pl).

2.11. Desenho dos *primers* e condições de PCR para identificação dos potenciais marcadores SCAR

Os *primers* para gerar os potenciais marcadores SCAR foram desenhados com o auxílio do programa *PrimerSelect*[®] (Lasergene, Madison, WI), utilizando as sequências originais dos *primers* RAPD, seguindo os seguintes passos: **(1)** Colocou-se as sequências no aplicativo Word, para encontrar o primer RAPD “Forward” e “Reverse”, a exemplo o OP-C19, cuja sequência 5’-3’ é “GTTGCCAGCC” e sua sequência reversa é portanto “GGCTGGCAAC”; **(2)** Às sequências foram adicionados nucleotídeos e o novo par de primers foi testado no *PrimerSelect* (Lasergene, Madison, WI) que analisa vários parâmetros que influenciam o sucesso do uso do primer em questão na reação de PCR (presença de dímeros, conteúdo de GC). Caso não fosse aprovado adicionavam-se ou retiravam-se nucleotídeos até encontrar um par de *primers* com qualidade adequada para uso em PCR. **(3)** O par de *primers* desenhado foi **SCAR C19Forward** [5’ GTT-GCC-AGC-CCC-ATG-AGA-TTT-T 3’] e **SCAR C19Reverse** [5’ GTT-GCC-AGC-CGA-GGC-CAA-GTT-T 3’]. O mix da reação constituiu de 1,25µL de Tampão 10X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 1,25 µL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,5 µL de cada primer, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,2µL da enzima *Taq* Polimerase (5U/µL, Invitrogen), 5,05 µL de água Milli-Q e 3 µL de DNA, totalizando um mix de 12,5µL. As amplificações foram efetuadas em termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 programado para 35 ciclos, sendo que cada marcador SCAR possuiu um ciclo diferente de acordo com a T_m (temperatura de “melting”) de cada primer.

2.12. Análise dos prováveis recombinantes para a região englobando o locus *Ty-1* na população #1

Estabeleceu-se arbitrariamente que plantas resistentes são aquelas com notas variando de zero a 2,99 e plantas suscetíveis com notas variando de 3,00 a 4,00 (ver **Capítulo 2**). Os indivíduos prováveis recombinantes com os marcadores gerados pelos *primers* CAPS e SCAR-C19 na população #1, foram analisados com outros marcadores localizados no cromossomo 6 e ligados ao gene *Mi* e aos loci *Ty-1* e *Ty-3*.

Os indivíduos foram avaliados com o par de *primers* JB-1 [JB1F: 5'-AAC-CAT-TAT-CCG-GTT-CAC-TC-3' e JB1R: 5'-TTT-CCA-TTC-CTT-GTT-TCT-CTG-3'] (de Castro *et al.*, 2007); Aps-1 [ApsF: 5'-GGC-AGG-AGA-ATA-TGC-CAA-AA-3'; ApsR: 5'-CGT-TCC-ATT-CTC-AAC-CCA-TT-3'] (Williamson & Colwell 1991; de Castro *et al.*, 2007) e REX-1 [REX-F: 5'-TCG-GAG-CCT-TGG-TCT-GAA-TT-3' e REX-R: 5'-ATG-CCA-GAG-ATG-ATT-CGT-GA-3' (Williamson *et al.*, 1994). O mix da reação constituiu de 2,5 µL de Tampão 10X da enzima *Taq* Polimerase (100mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500mM KCl, Invitrogen), 2,5 µL de dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 1,0µL de cada primer, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,4 µL da enzima *Taq* Polimerase (5U/µL, Invitrogen), 13,1 µL de água Milli-Q e 3 µL de DNA, para um volume final de 25 µL.

As condições de amplificação para os *primers* Aps-1 e REX-1 foram as seguintes: etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 30 ciclos – desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto – e finalização com extensão a 72°C durante 10 minutos. Para o primer JB-1 os ciclos de amplificação foram: etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 20 ciclos – desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos – depois mais 10 ciclos – desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos –

e finalização com extensão a 72°C durante 10 minutos.

O mix da enzima de restrição foi composto de: 9,03 µL de água Milli-Q, 5,25 µL de Tampão 10X, 0,36 µL da enzima de restrição *Taq-1* (10U/ µL) e a mesma quantidade de BSA, totalizando um volume final de 15 µL. Foi utilizado para o corte, 10µL de produto amplificado. O regime utilizado pela enzima totalizou 4 horas a 65°C. Também foram utilizados o par de primers FLUW-25F e FLUW-25R, que possuem marcadores ligados ao loci *Ty-3* e que já foram descritos anteriormente.

2.13. Elaboração do mapa genético e do mapa físico englobando a avaliação fenotípica da resistência a ToSRV dos indivíduos da população #1, os novos marcadores SCAR e RAPD e outros marcadores ligados ao locus *Ty-1* no cromossomo 6

A distância dos marcadores utilizados na população #1 foi calculada dividindo o número de recombinantes pelo total de indivíduos da população. Para o mapa de ligação genético, o alinhamento dos marcadores e os cálculos das distancias genéticas (em cM) será feito utilizando o programa *MAPMAKER computer package* (Lander *et al.* 1987). O mapa de ligação final será construído com base em *LOD scores* de valor igual ou superior a 5.0. Para a elaboração do mapa físico, os marcadores do locus *Ty-1* no cromossomo 6, amplificados pelos *primers* UWTY-1, SCAR-C19, JB-1, REX-1 e Aps-1 foram sequenciados e através do programa BLASTn (nucleotide to nucleotide)/SGN Tomato Combined, suas localizações foram ancoradas no genoma do tomateiro disponível na página eletrônica do SGN (www.solgenomics.net/tools/blast/index.pl).

3. RESULTADOS

3.1. Genotipagem das linhagens parentais das populações #1 e #2 para marcadores ligados ao loci *Ty-1*, *Mi* e *Ty-3*

A genotipagem das linhagens parentais das populações #1 e #2, com marcadores ligados aos loci *Ty-1*, *Mi* e *Ty-3*, foi feita inicialmente com marcadores previamente descritos em ligação com essas regiões genômicas, visando identificar a presença de polimorfismos para esses marcadores nas duas populações (**Figura 1**). Essa análise também serviu para comparação do padrão de polimorfismo gerado pelos *primers* RAPD com ausência/presença do alelo *Ty-1*.

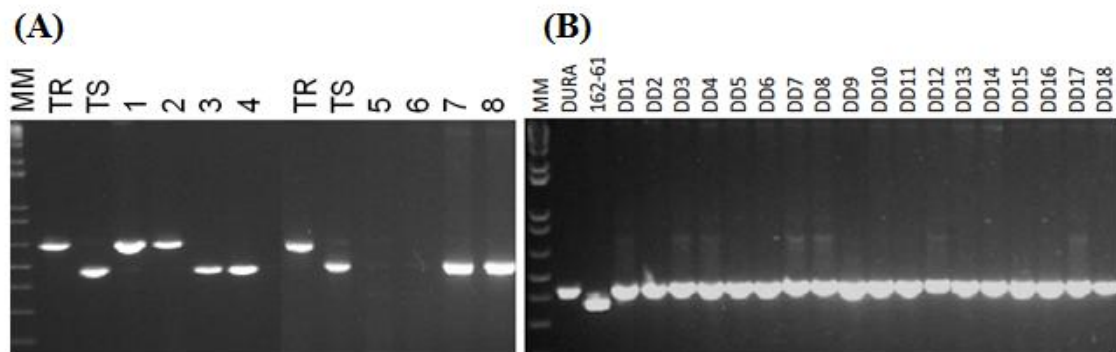


Figura 1 – Painel A: padrão dos marcadores moleculares codominantes associados com o locus *Ty-3* amplificados pelo par de *primers* FLUW-25F e FLUW-25R. TR = testemunha homocigota para o alelo dominante/resistente (*Ty-3/Ty-3*); TS = testemunha homocigota para o alelo recessivo/suscetível (*ty-3/ty-3*); 1 e 2 = ‘LAM 162-*Ty*’ (homocigota *Ty-3/Ty-3*); 3 e 4 = ‘LAM 162-*Mi*’ (homocigota *ty-3/ty-3*); 5 e 6 = ‘LAM144-R’ (ausência de amplicons para esse marcador); 7 e 8 = ‘LAM144-S’ (homocigota *ty-3/ty-3*). **Painel B:** padrão de marcadores ligados ao gene *Mi* amplificados pelo primer *Mi23*, onde Dura = híbrido ‘Duradoro’ (*mi/mi*; testemunha suscetível); ‘LAM 162-61’ = testemunha resistente (*Mi/Mi*) e DD_n amostra de indivíduos F₂ segregantes da população #1, todos apresentando ausência do alelo dominante *Mi*. Análise em gel de agarose 1,5%. MM = Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.2. Genotipagem da população #1

Uma prévia genotipagem da população indicou a segregação do marcador derivado do CAPS UW_{Ty1} (Maxwell *et al.*, 2006). Esse sistema CAPS gera um marcador codominante em extrema ligação com o locus *Ty-1*, o que permitiu a diferenciação e visualização das diferentes classes genotípicas [i.e. homozigoto resistente, heterozigoto suscetível e homozigoto suscetível] de cada indivíduo de linhagens quase isogênicas parentais e dos indivíduos da população #1 (**Figura 2**).

Essa análise serviu para comparação, em análises subsequentes, do padrão de polimorfismo gerado pelos *primers* RAPD, que são dominantes, com ausência/presença do alelo *Ty-1*. Nesse ensaio de genotipagem, do total de 586 plantas da população #1, foram observadas as seguintes frequências de classes genotípicas: 117 plantas apresentaram genótipo associado com plantas homozigotas resistentes (bandas 320 pb + 150 pb); 307 genótipos associados com plantas heterozigotas (450 pb + 320 pb + 150 pb) e 162 genótipos associados com plantas homozigotas suscetíveis (presença exclusiva da banda de 450 pb).

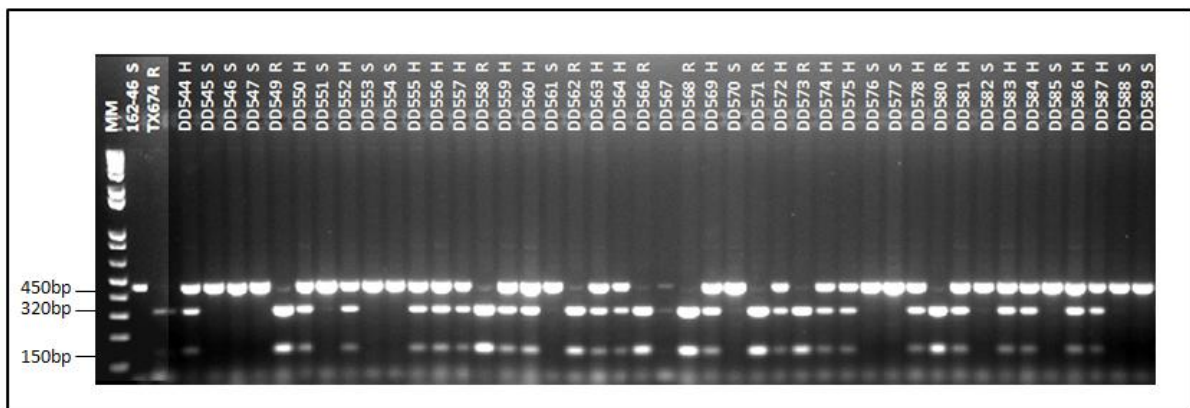


Figura 2 – Exemplo do perfil de bandas amplificadas pelo primer CAPS (Maxwell *et al.*, 2006) obtido com uma amostra de indivíduos F_2 da população #1 (LAM 144R x LAM 144S). Indivíduos homozigotos para o marcador associado com o locus dominante *Ty-1* (R) = duas bandas (150 pb e 320 pb aproximadamente); Indivíduos homozigotos para o marcador associado com o locus de susceptibilidade *ty-1* (S) = uma banda (450 pb); Indivíduos heterozigotos (H) = três bandas parentais (450 pb, 320 pb e 150 pb). Análise em gel de agarose 1,5%. MM = Marcador Molecular de 1Kb Plus DNALadder (Invitrogen).

3.3. Análise e seleção dos possíveis marcadores RAPD

3.3.1. Etapas de seleção de primers RAPD promissores para mapeamento do locus *Ty-1* na população #1

Para a população #1, na primeira etapa, amplicons polimórficos foram observados após ensaios com 56 *primers* RAPD. A estabilidade dos polimorfismos desses amplicons foi avaliada tomando-se amostras de seis indivíduos F_2 homocigotos para o marcador associado com o locus dominante *Ty-1* e seis indivíduos F_2 homocigotos para o marcador associado com o locus recessivo *ty-1*. Essas análises permitiram selecionar um total de 21 *primers* RAPD promissores para futuras etapas de mapeamento. Na última etapa de seleção, que constituiu da validação em 96 indivíduos segregantes da população F_2 , nove *primers* RAPD (OPC-08, OPC-19, OPK-13, OPM-06, OPM-11, OPO-05, OPO-15, OPR-04, OPT-01) apresentaram cosegregação com o locus *Ty-1*, sendo que três desses *primers* (OPM-06, OPM-11, OPR-04) também foram capazes de identificar polimorfismos entre os parentais da população #2. (Figura 3 e Tabela 1).

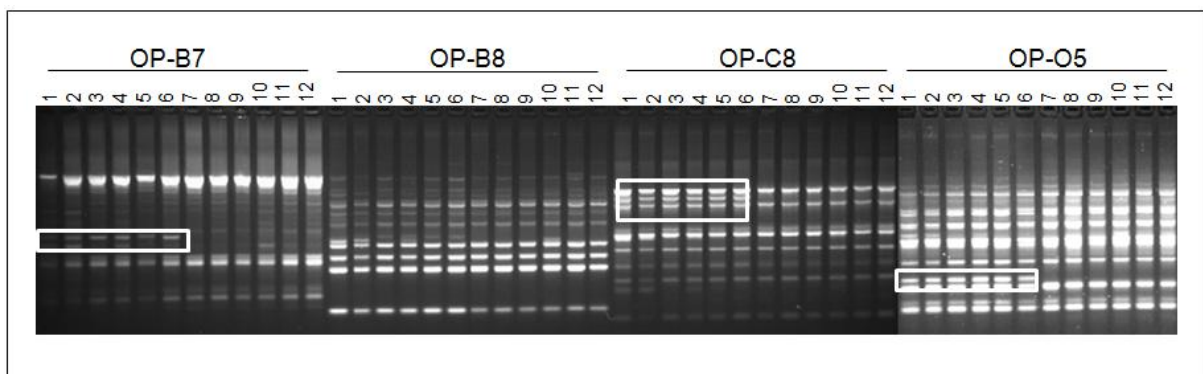


Figura 3 – Grupo de primers RAPD selecionados durante a 2ª etapa de seleção. Indivíduos 1-6: homocigotos resistentes; indivíduos 7-12: homocigotos suscetíveis. O *primer* OPB-08 não foi capaz de reproduzir o polimorfismo, anteriormente observado, ao ampliar a avaliação para 6 indivíduos contendo o *Ty-1* em dupla dosagem (homocigotos resistentes) e 6 indivíduos com ausência do locus *Ty-1* (homocigotos suscetíveis). Os primers OPC-08, OPO-05 foram capazes de reproduzir o polimorfismo, assim como o OPB-07, porém este de forma pouco

estável. Análise em gel de agarose 1,5%.

3.3.2. Etapas de seleção de marcadores RAPD na população #2

Para a população #2, a seleção foi feita até a segunda etapa e utilizando os parentais, haja vista que a F₂ estava em processo de avaliação. Quatorze *primers* se mostraram relativamente estáveis e revelaram polimorfismos exclusivamente para esta população (OPA-16, OPB-12, OPB-20, OPD-03, OPF-19, OPH-19, OPI-06, OPO-20, OPP-05, OPP-09, OPQ-04, OPQ-11, OPQ-19, OPT-18), que ainda não foram ampliados para indivíduos F₂ e um total de nove *primers* revelaram os mesmos amplicons polimórficos nas duas populações estudadas (OPF-13, OPG-12, OPH-07, OPH-15, OPK-08, OPM-06, OPM-11, OPR-04, OPS-02) e três *primers* (OPK-04, OPS-13 e OPV-04) geraram polimorfismos em ambas populações, porém distintos (**Figura 4**). Dos *primers* polimórficos para as duas populações apenas os OPM-06, OPM-11 e OPR-04 permaneceram estáveis ao serem ampliados para indivíduos F₂ da população #1.

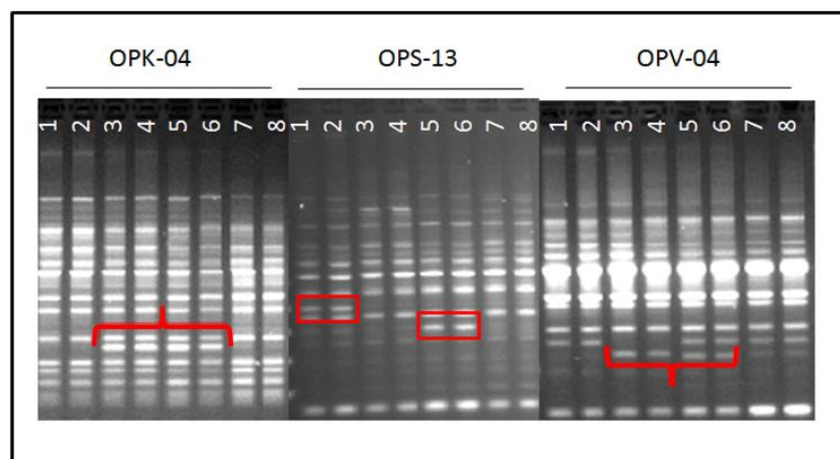


Figura 4 – Mesmos *primers* gerando polimorfismos distintos nas duas populações. Indivíduos 1 e 2: LAM144R; Indivíduos 3 e 4: LAM144 S; Indivíduos 5 e 6: LAM162 Ty; Indivíduos 7 e 8: LAM162 Mi. *Primer* OPK-04 o mesmo polimorfismo de 510 pb, porém presente em indivíduos LAM144 S e LAM162 Ty; *Primer* OPS-13 polimorfismo de 500 pb presente em LAM144 R e polimorfismo de 450 pb presente em LAM162 Ty; *Primer* OPV-04 o mesmo polimorfismo de 500pb, porém presente em LAM144 S e LAM162 Ty.

Tabela 1 – Etapas de seleção de primers RAPD observados como promissores para o mapeamento do locus *Ty-1* na população de tomate F_2 segregante #1, resultante do cruzamento de LAM 144R x LAM 144S. Na primeira etapa, fez-se uma seleção dos *primers* utilizando indivíduos contrastantes homocigotos resistentes (*Ty-1/Ty-1*) e homocigotos suscetíveis (*ty-1/ty-1*). Na segunda etapa, os *primers* capazes de gerar polimorfismo foram testados em 12 indivíduos contrastantes quanto ao locus dominante *Ty-1* (seis com presença e seis com ausência) e na última etapa os *primers* capazes de manter o polimorfismo foram validados com uma amostra de 96 indivíduos da população F_2 .

Etapas de seleção de primers	Primers RAPD	Total de primers
1ª ETAPA	OPB-05, OPB-07, OPB-08, OPB-15, OPB-18, OPC-04, OPC-08, OPC-10, OPC-19, OPD-13, OPD-18, OPE-11, OPE-16, <u>OPF-13*</u> , OPF-15, OPG-12, OPG-18, OPH-04, <u>OPH-07</u> , OPH-12, OPH-15, OPH-17, OPI-01, OPI-06, OPI-13, OPI-14, OPJ-01, OPJ-09, OPJ-16, OPK-03, OPK-04, <u>OPK-08</u> , OPK-13, OPK-20, OPL-06, <u>OPM-06</u> , OPM-11, OPO-05, OPO-15, OPP-03, OPP-04, OPQ-02, <u>OPR-04</u> , OPR-10, OPS-06, OPS-13, OPS-20, <u>OPT-08</u> , OPT-01, OPU-15, OPU-16, OPV-04, OPV-06, OPY-06, OPZ-05, OPZ-11.	56
2ª ETAPA	OPB-05, OPB-15, OPC-04, OPC-08, OPC-19, <u>OPF-13</u> , OPG-12, <u>OPH-07</u> , OPH-15, OPI-13, OPK-04, <u>OPK-08</u> , OPK-13, OPK-20, <u>OPM-06</u> , <u>OPM-11</u> , OPO-05, OPO-15, <u>OPR-04</u> , OPS-02, OPT-01.	21
3ª ETAPA	OPC-08, OPC-19, OPK-13, <u>OPM-06</u> , <u>OPM-11</u> , OPO-05, OPO-15, <u>OPR-04</u> , OPT-01.	09

*Os *primers* assinalados também geraram polimorfismos na população #2.

3.3.3. Características dos *primers* RAPD selecionados para mapeamento do locus

Ty-1 na população #1

Os primers selecionados para mapeamento do locus *Ty*-1 na população #1 após as três etapas de validação estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Lista de primers RAPD identificados como capazes de gerar polimorfismos estáveis entre as linhagens parentais e indivíduos segregantes para o locus *Ty*-1 na população #1 de tomate.

Primers	Tamanho do(s) Amplicon(s) polimórfico(s) (pb)	Origem do polimorfismo	Sequência dos <i>primers</i> RAPD (5'-3')
OPC-08	550	'LAM144-S'	TGGACCGGTG
OPC-19	800	'LAM144-S'	GTTGCCAGCC
OPK-13	1300	'LAM144-R'	GGTTGTACCC
OPM-06	350	'LAM144-S'	CTGGGCAACT
OPM-11	470	'LAM144-R'	GTCCACTGTG
OPO-05	450	'LAM144-R'	CCCAGTCACT
OPO-15*	500	'LAM144-R'	TGGCGTCCTT
OPR-04	200/400	'LAM144-R'	CCCGTAGCAC
OPT-01	250	'LAM144-R'	GGGCCACTCA

* Polimorfismo de intensidade.

Os primers OPC-08, OPC-19 e OPM-06 geraram amplicons em repulsão, ou seja, associados preferencialmente com plantas classificadas como heterozigotas e como homozigotas para o marcador associado com o locus recessivo *ty*-1 (suscetibilidade a begomovírus). Os primers OPC-08 e OPC-19 geraram amplicons de aproximadamente 550 pb e 800 pb, respectivamente, sendo que não houve recombinação em nenhum dos indivíduos

avaliados (**Figura 5**). O primer OPM-06 gerou um amplicon de aproximadamente 350 pb para o qual três indivíduos apresentaram segregação. Os *primers* OPK-13, OPM-11, OPO-05, OPO-15 e OPR-04 mostraram-se ligados ao locus de resistência *Ty-1*, já que geraram amplicons exclusivamente para indivíduos previamente classificados como resistentes e para heterozigotos. Os primers OPM-11 (**Figura 6**) e OPR-04 (**Figura 7**) tiveram boa reprodutibilidade, sendo também observada uma ausência de recombinantes. OPM-11 gerou um amplicon de aproximadamente 470 pb enquanto o primer OPR-04 gerou dois amplicons polimórficos com 200 pb e 400 pb. Os primers OPO-05, OPK-13 e OPT-01 geraram amplicons próximos a 450 pb, 1300 pb e 250 pb, respectivamente, porém mostraram baixa reprodutibilidade. O primer OPO-15 gerou polimorfismo de intensidade para uma amplicons de cerca de 500 pb. Esse polimorfismo se mostrou altamente estável e reproduzível, estando presente em indivíduos classificados como homozigotos para o marcador associado com o locus dominante *Ty-1* bem como em heterozigotos. Não foi observado nenhum evento de recombinação entre o fator de resistência e o marcador OPO-15 (**Figura 8**).

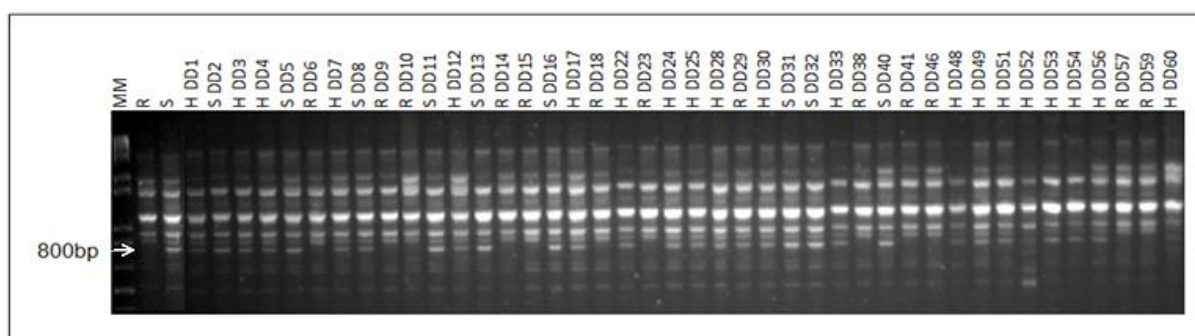


Figura 5 – Padrão de amplicons gerado pelo *primer* OPC-19, em indivíduos (indicados pelos números) da População #1. A seta destaca o amplicon polimórfico de aproximadamente 800 pb em indivíduos suscetíveis (S) e heterozigotos (H) e ausência em indivíduos resistentes (R). Análise em gel de agarose 1,5%. MM – Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

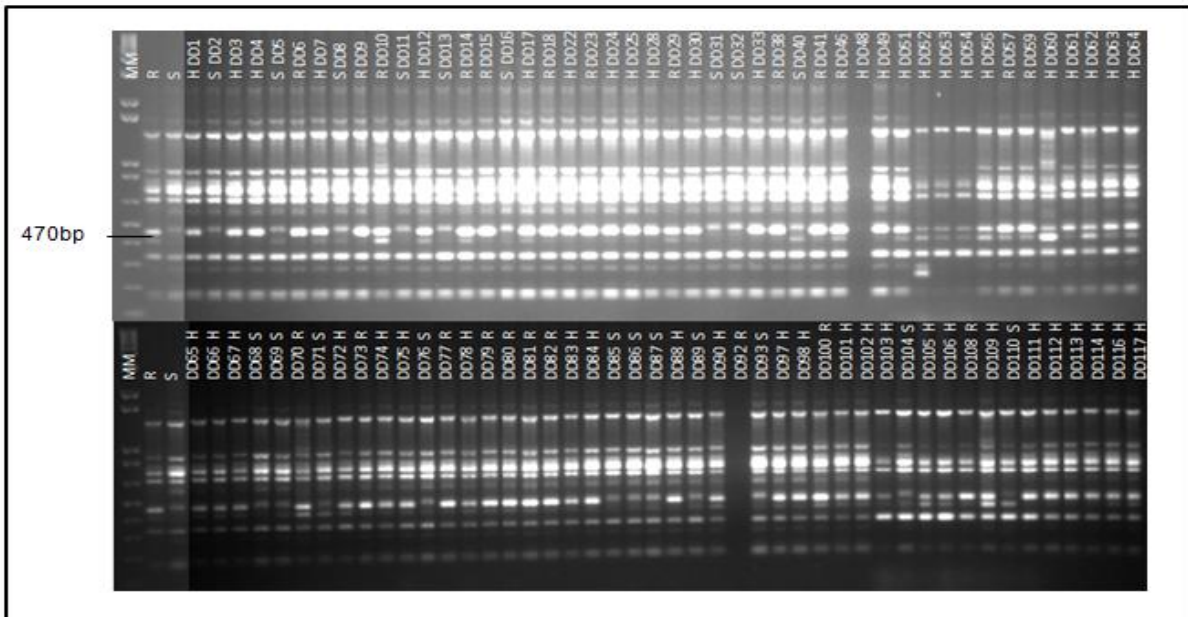


Figura 6 – Padrão de amplicons gerado pelo *primer* OPM-11, em 94 indivíduos da População #1, 3ª etapa de seleção, onde há presença de banda de aproximadamente 470 pb em indivíduos resistentes (R) e heterozigotos (H) e ausência em indivíduos suscetíveis (S). Análise em gel de agarose 1,5%. MM – Marcador Molecular de 1 Kb Plus DNALadder (Invitrogen).

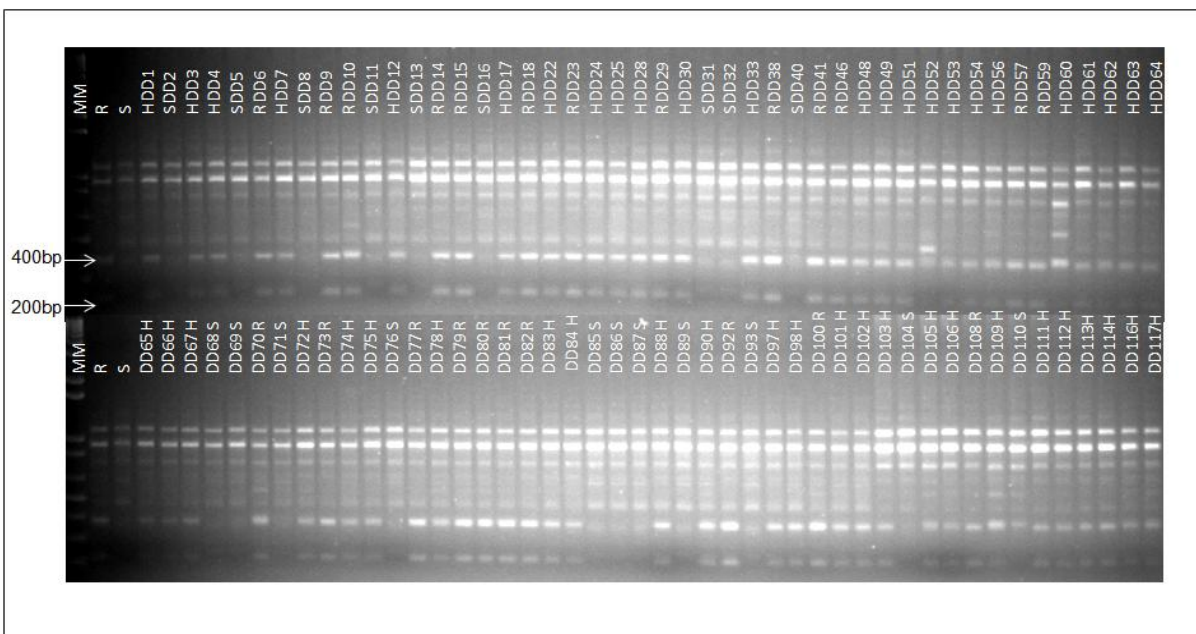


Figura 7 – Padrão de amplicons gerado pelo *primer* OPR-04, em 96 indivíduos da População #1, 3ª etapa de seleção, onde há presença de duas bandas de aproximadamente 400 e 200 pb em indivíduos resistentes (R) e heterozigotos (H) e ausência em indivíduos suscetíveis (S). Análise em gel de agarose 1,5%. MM – Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

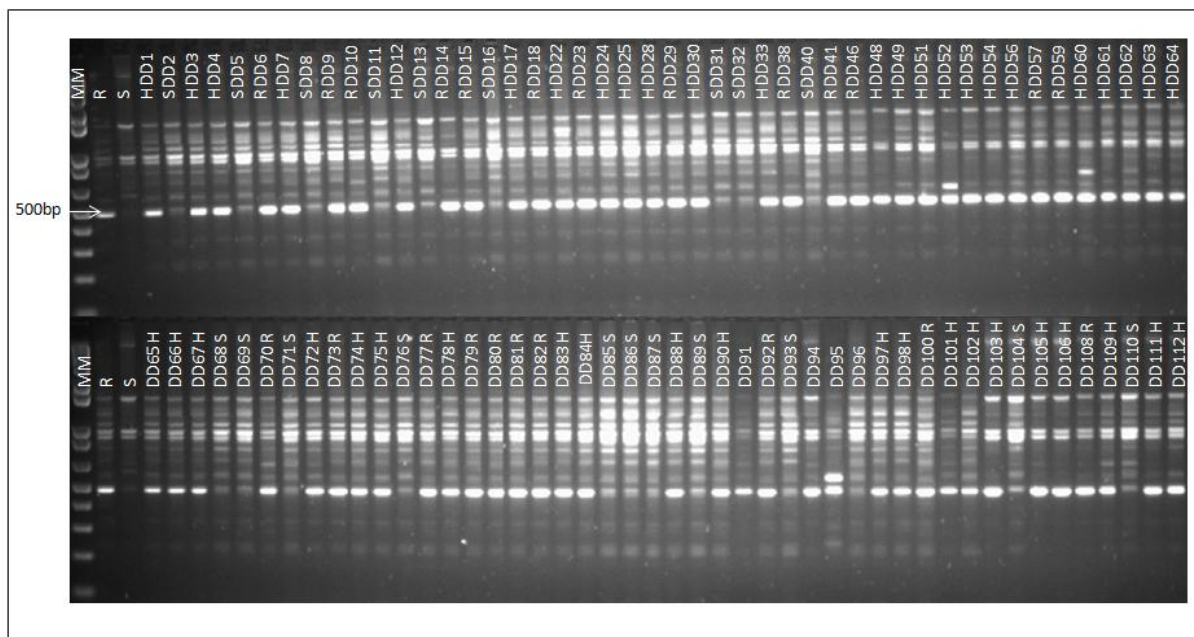


Figura 8 – Padrão de amplicons gerado pelo *primer* OPO-15, em 96 indivíduos da População #1, 3ª etapa de seleção, onde há presença de banda de aproximadamente 500 pb em indivíduos resistentes (R) e heterozigotos (H) e banda mais fraca em indivíduos suscetíveis (S). Análise em gel de agarose 1,5%. MM – Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.4. Análise dos *primers*/marcadores SCAR

Os *primers* capazes de gerar os marcadores mais estáveis e robustos foram selecionados. Os amplicons polimórficos foram removidos dos géis, clonados e sequenciados, com o objetivo de desenhar *primers* do tipo SCAR. Ao todo foram desenhados dez *primers* SCAR (Tabela 3). No entanto, os estudos foram conduzidos com apenas três (SCAR-M11, SCAR-O5 e SCAR-C19), pois o restante necessita de maiores otimizações metodológicas em relação às concentrações dos reagentes e temperatura de anelamento.

Os protocolos de PCR foram otimizados para os marcadores SCAR-O5 e SCAR-M11. Os ciclos que apresentaram melhores resultados foram constituídos dos seguintes parâmetros: etapa inicial de desnaturação a 94°C/2 minutos, seguida por 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58,5°C por 1 minuto e extensão a 72°C durante 50 segundos) e finalização com uma extensão a 68°C por 10 minutos.

O marcador gerado pelo SCAR-M11 destacou um polimorfismo dominante e de

intensidade (**Figura 9**), porém ao ser ampliado para os indivíduos F₂, da população #1, o marcador não se mostrou estável, não sendo possível discernir com confiança os diferentes genótipos (**Figura 10**). Esse marcador está localizado no cromossomo 6 de *S. lycopersicum* (SGN Tomato Combined), distribuído em várias regiões de [14.191.086 pb – 29.713.898 pb].

Por sua vez, o marcador gerado pelo SCAR-O5 apresentou-se dominante, com tamanho de aproximadamente 450 pb e mostrou-se ligado a indivíduos com introgressão de *S. chilense* (**Figura 11**). Além disso, a reprodutibilidade do marcador SCAR-O5 se mostrou elevada, não sendo observada nenhuma segregação entre os 96 indivíduos avaliados. De acordo com o sequenciamento, esse amplicon possui 83% de identidade com um segmento do cromossomo 6 de *S. lycopersicum* (SGN Tomato Combined). Análises via Blastn indicaram diferentes níveis de identidade genética com múltiplas regiões do cromossomo 6: [12.008.001 pb – 12.009.200 pb]; [15.357.001 pb – 15.358.100 pb]; [15.408.501 pb – 15.409.900 pb]; [17.909.801 pb – 17.911.000 pb]; [24.985.801 pb – 24.987.000 pb]. O cromossomo 6 do tomateiro possui o tamanho de 46.041.636 de pares de bases.

Tabela 3 – Primers SCARs desenhados a partir de sequências polimórficas reveladas por marcadores RAPDs, em plantas isolinhas contrastantes quanto a presença do locus *Ty-1*, para duas populações com diferentes eventos de introgressão de *S. chilense* e localização cromossômica de acordo com o genoma do tomateiro disponível na página eletrônica do SGN (www.solgenomics.net/tools/blast/index.pl).

SCARs	Sequência 5' - 3'	Conteúdo em % GC	Temperatura anelamento (°C)	Cromossomo
SCAR-C8	F: TGGACCGGTGCCACGAA	64.7	62.0	06
	R: TGGACCGGTGGGGGGCA	76.5	66.8	
SCAR-C19	F: GTTGCCAGCCCCATGAGATTTT	50.0	62.7	06
	R: GTTGCCAGCCGAGGCCAAGTTT	59.1	66.4	
SCAR-M11	F: CACTGTGGAGGTCCTGAAACAC	45.5	64.5	06
	R: GTCCACTGTGATAACCTGCTAA	58.3	60.8	
SCAR-O5a	F: CCCAGTCACTCA	58.3	47.2	06
	R: CCCAGTCACTAT	50.0	43.7	
SCAR-O5b	F: CCCAGTCACTCAGTCG	62.5	59.3	06
	R: CCCAGTCACTATACCCTTA	47.4	58.0	
SCAR-O15	F: TGGCGTCCTTCC	66.7	50.6	NE*
	R: TGGCGTCCTTGC	66.7	50.6	
SCAR-P5a	F: CCCC GGTAACAAGACGATAC	55.0	62.4	06
	R: CCCC GGTAACAGGTGGACGG	70.0	68.6	
SCAR-P5b	F: CCCC GGTAACAAGAC	60.0	56.2	06
	R: CCCC GGTAACAGGTG	66.7	58.9	
SCAR-R4	F: CCCGTAGCACCTA	61.5	51.7	06
	R: CCCGTAGCACAGC	69.2	54.8	
SCAR-T1	F: GGGCCACTCAGACT	64.3	55.5	11
	R: GGGCCACTCATCTA	57.1	52.6	

*NE= Não encontrado.

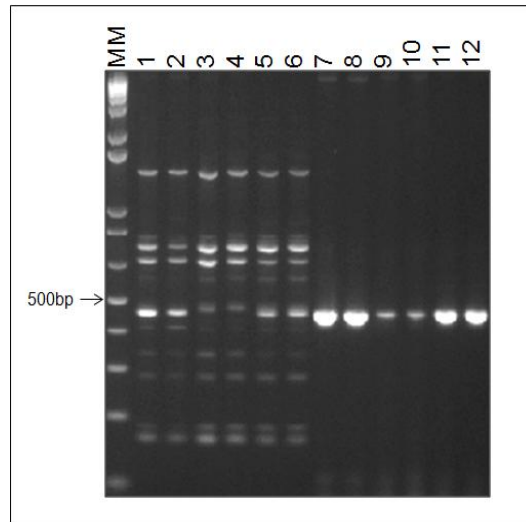


Figura 9 – Dois perfis de bandas: do lado esquerdo perfil do *primer* OP-M11 e do lado direito perfil do marcador SCAR-M11. O primeiro com polimorfismo dominante de presença/ausência e o segundo com polimorfismo dominante de intensidade. Indivíduos homocigotos resistentes: 1, 2, 7 e 8; indivíduos homocigotos suscetíveis: 3, 4, 9 e 10 e indivíduos heterocigotos: 5, 6, 11 e 12. Análise em gel de agarose 1,5%. MM = Marcador Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

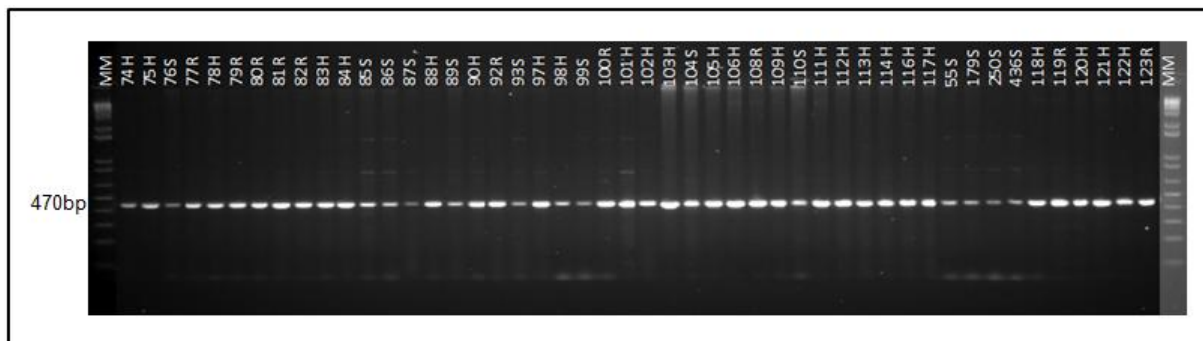


Figura 10 – Perfil de bandas amplificadas pelo *primer* SCAR-M11, com o tamanho de 470 pb, mostrando sua baixa reprodutibilidade. Os números representam cada indivíduo da população. Análise em gel de agarose 1,5%. MM = Marcador Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

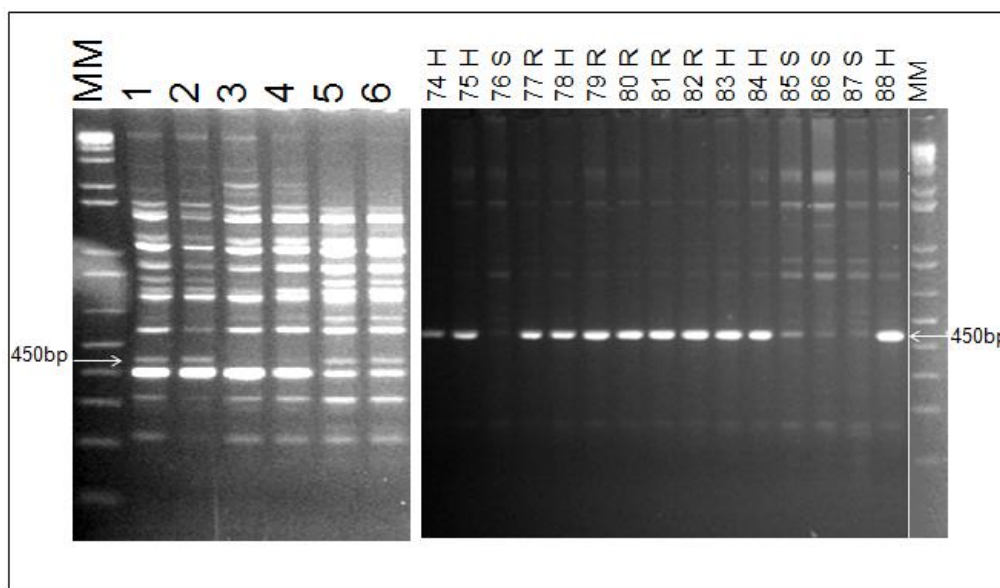


Figura 11 – À esquerda, perfil amplificado pelo *primer* RAPD OP-O5, indivíduos 1 e 2 = homozigotos resistentes (banda de aproximadamente 450pb presente); indivíduos 3 e 4 = homozigotos suscetíveis (banda ausente) e indivíduos 5 e 6 = heterozigotos (banda presente). À direita, perfil de marcadores gerados pelo SCAR-O5, com o tamanho de 450 pb, em uma amostra de indivíduos da população#1, onde os números representam cada indivíduo da população. Indivíduos homozigotos resistentes (R), heterozigotos (H) e suscetíveis (S). Análise em gel de agarose 1,5%. MM = Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.4.1. Características do marcador molecular gerado pelo *primer* SCAR-C19

Dentre o painel de *primers* do tipo SCAR desenvolvido no presente trabalho, o SCAR-C19 foi o único capaz de gerar polimorfismos altamente reproduzíveis. Além disso, esse marcador mostrou-se codominante e, portanto apto a diferenciar plantas homozigotas de heterozigotas. O *primer* SCAR-C19 foi desenhado a partir de amplicons gerados pelo RAPD OPC-19, que possui um polimorfismo dominante e derivado do parental suscetível, ou seja, as bandas polimórficas estavam presentes em repulsão (preferencialmente presentes em plantas homozigotas suscetíveis e heterozigotas). Depois de vários ensaios com diferentes temperaturas de anelamento e tempos de extensão, chegou-se a um protocolo otimizado para o marcador SCAR-C19 constituído pelos parâmetros a seguir: etapa inicial de desnaturação a

94°C/2 minutos, seguida por 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos) e finalização com uma extensão a 68°C por 10 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), corados por brometo de etídeo. A eletroforese foi feita em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), a 150 V, por um período de aproximadamente 7 horas. Este maior tempo de corrida do gel se mostrou fundamental, já que as bandas polimórficas geradas são muito próximas umas das outras, necessitando de um tempo maior para separá-las. O amplicon associado com os indivíduos suscetíveis foi de aproximadamente 800 pb, o mesmo gerado pelo respectivo amplicons RAPD. Os indivíduos resistentes apresentaram um amplicon ligeiramente mais baixo. Um fato interessante e inusitado foi que os indivíduos heterozigotos apresentaram a formação de um heteroduplex com três bandas: banda associada com o alelo resistente (mais baixa) + banda associada com o alelo suscetível (intermediária) + banda “não parental” (mais alta) (**Figuras 12 e 13**). Em determinadas análises em gel, no entanto, apenas as duas bandas parentais se mostravam visíveis, sugerindo que a formação estável do heteroduplex codominante poderia ser também ser objeto de otimização metodológica.

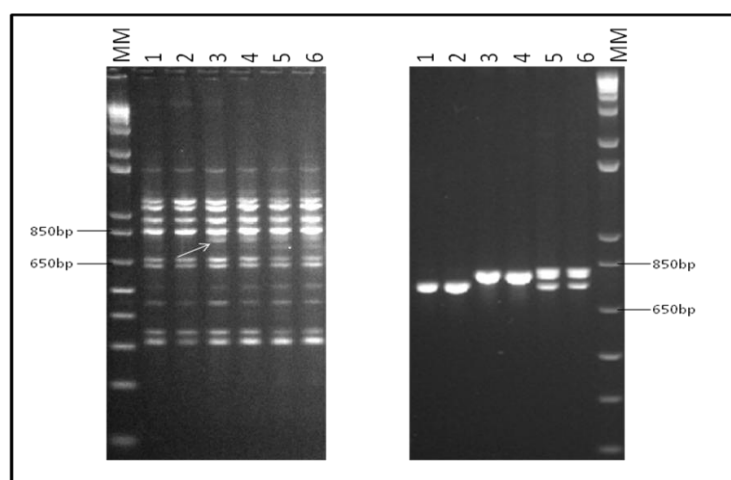


Figura 12 – À esquerda perfil de bandas amplificadas pelo *primer* RAPD OPC-19, onde há presença de bandas em indivíduos homozigotos suscetíveis (3,4) e heterozigotos (5,6) e ausência em indivíduos homozigotos resistentes (1,2). À direita padrão amplificado pelo

primer codominante SCAR-C19, onde banda alta, aproximadamente 800 pb, caracteriza indivíduos homozigotos suscetíveis (3,4), banda baixa indivíduos homozigotos resistentes (1,2) e os indivíduos heterozigotos (5,6) são caracterizados pelas duas bandas parentais. Análise em gel de agarose 1,5%. MM – Marcador Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

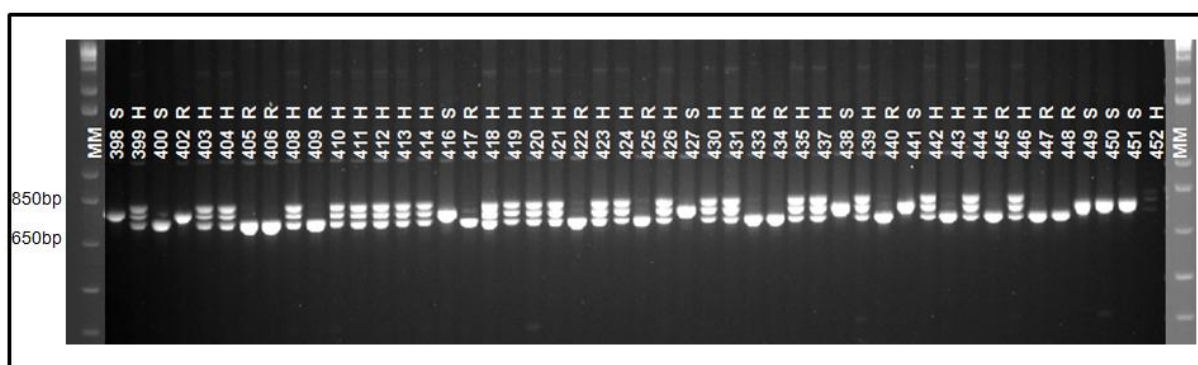


Figura 13 – Perfil dos marcadores gerados pelo *primer* SCAR-C19 na F₂ segregante da População #1, onde a banda alta caracteriza indivíduos suscetíveis (S), banda baixa indivíduos resistentes (R) e os indivíduos heterozigotos (H) são caracterizados pelas duas bandas parentais mais uma banda extra, heteroduplex. Os números representam cada indivíduo da população. Análise em gel de agarose 1,5%. MM – Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

A pequena diferença entre as bandas parentais foi causada por uma deleção de 34 pares de bases na sequência do parental resistente amplificada (**Figura 14**), há presença de outras deleções menores espalhadas pela sequência.

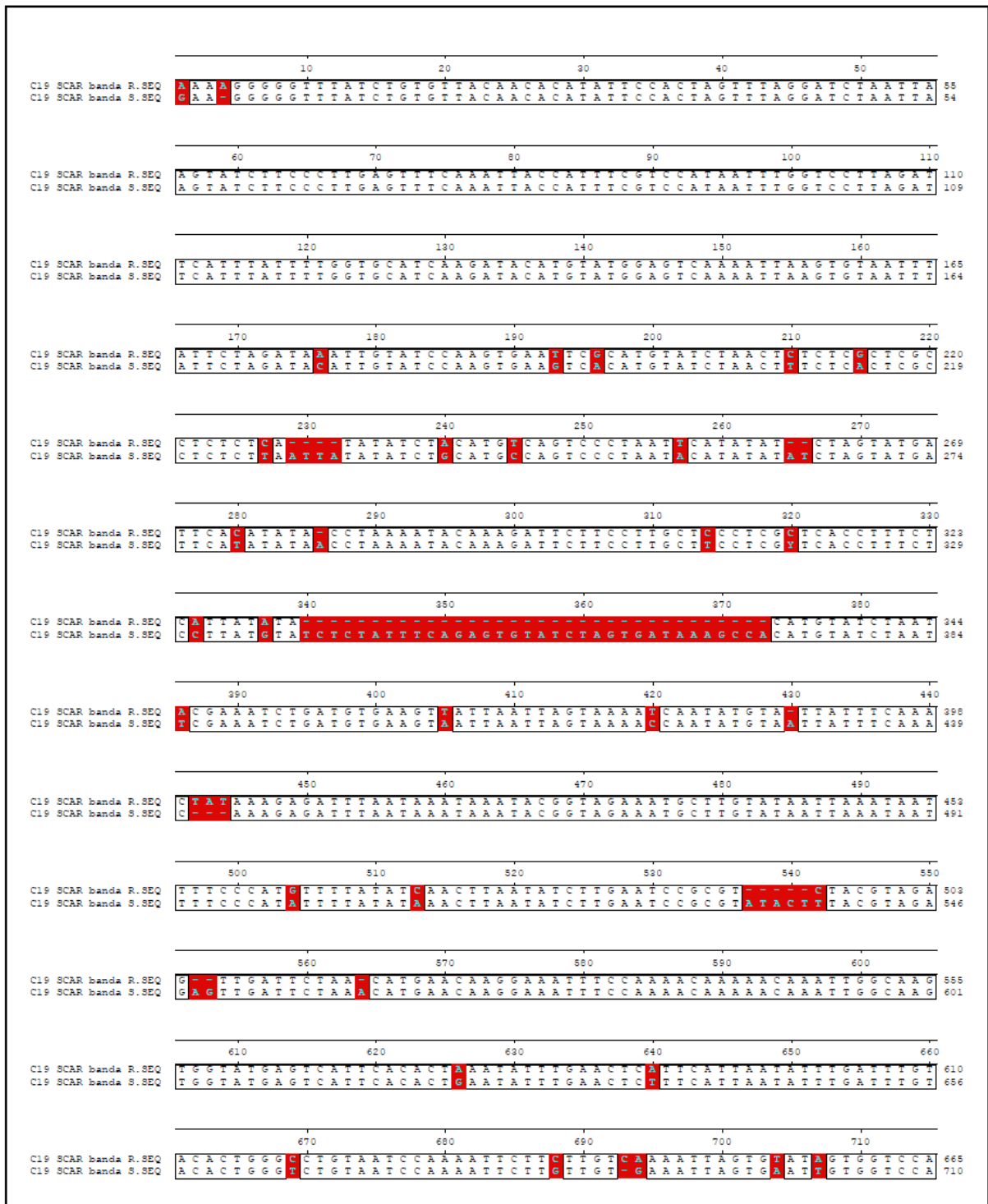


Figura 14 – Alinhamento [realizado por meio do software *Megalign (Lasergene)* DNASTar] das seqüências amplificadas pelo SCAR-C19 correspondendo a indivíduos com marcadores homocigotos para o locus de resistência (*Ty-1*) – banda R – e indivíduos com marcadores homocigotos para o locus de suscetibilidade (*ty-1*) – banda S. Uma deleção maior de 34 pb pode ser observada associada com em indivíduos *Ty-1/ Ty-1*. Essa deleção explica a característica codominante dos marcadores amplificadas pelo SCAR-C19.

3.5. Análise dos potenciais recombinantes e distância genética (cM) dos *primers* SCAR-C19 e UWTy-1.

Os marcadores ligados ao gene *Ty-1* e os gerados pelo primer SCAR-C19 foram validados com todos os 586 indivíduos segregantes na população #1. A genotipagem de sete indivíduos homozigotos resistentes para o primer SCARC19, divergiu da genotipagem feita com o primer CAPS UWTy1, que amplificou marcadores heterozigotos para esses indivíduos (**Tabela 3**), sendo que em nenhum dos casos eles foram considerados prováveis recombinantes, já que as notas foram todas abaixo do limite máximo de 2,99 para uma determinada planta ser classificada como resistente/tolerante. A distância genética desses dois marcadores, calculada para a população #1, é de 2,21 cM, considerando que houve 13 recombinantes em uma população de 586 indivíduos. Dois indivíduos (DD448 e DD92) com genótipo homozigoto resistente e oito indivíduos (DD114, DD106, DD263, DD356, DD521, DD552, DD638 e DD624) com genótipo heterozigoto tiveram nota 3, um heterozigoto (DD132) teve nota 4, dois (DD315 e DD650) indivíduos com genótipo homozigoto suscetível tiveram nota 2, totalizando treze potenciais recombinantes.

Tabela 3 – Lista das divergências observadas entre a genotipagem de indivíduos F₂ da população #1, para marcadores amplificados pelo SCAR-C19 e CAPS UWTy-1 e as notas da avaliação (44 dias após inoculação).

Indivíduos	Genótipo CAPS	Genótipo SCAR	Escala de Notas*
DD155	Heterozigoto	Homozigoto R	2
DD156	Heterozigoto	Homozigoto R	2
DD160	Heterozigoto	Homozigoto R	0
DD279	Heterozigoto	Homozigoto R	1
DD303	Heterozigoto	Homozigoto R	1
DD321	Heterozigoto	Homozigoto R	0
DD443	Heterozigoto	Homozigoto R	0

Esses prováveis recombinantes foram avaliados com os marcadores Aps-1, JB-1, REX-1 e FLUW-25, para confirmação dos genótipos. O primer FLUW-25 apesar de ser codominante, comportou-se como dominante para a população #1 e o primer JB-1 possui marcadores dominantes e, portanto esses dois primers não foram úteis para comparação com os outros dois primers codominantes SCAR e CAPS, em se tratando de indivíduos heterozigotos. O primer FLUW-25 amplificou banda de aproximadamente 450pb para plantas heterozigotas e com ausência de introgressão de *S. chilense* e não houve amplificação para plantas com presença do locus *Ty-1* em homozigose. O primer JB-1 amplificou duas bandas (500 pb e 420 pb, aproximadamente) para indivíduos com presença do locus *Ty-1* e banda de 420 pb para indivíduos suscetíveis. O primer Aps-1 amplificou duas bandas (650 pb, 380 pb) para indivíduos homozigotos resistentes (*Ty-1/Ty-1*), três bandas (650 pb, 250 pb e 100 pb) para homozigotos suscetíveis (*ty-1/ty-1*) e todas as bandas para heterozigotos (*Ty-1/ty-1*). O primer REX-1 amplificou duas bandas (600pb e 150pb) para indivíduos resistentes homozigotos, uma banda (700 pb) e heterozigotos com as três bandas (**Figura 15**). Não houve divergência entre a genotipagem feita pelo SCAR e CAPS e os primers Aps-1, REX-1, JB-1 e FLUW-25.

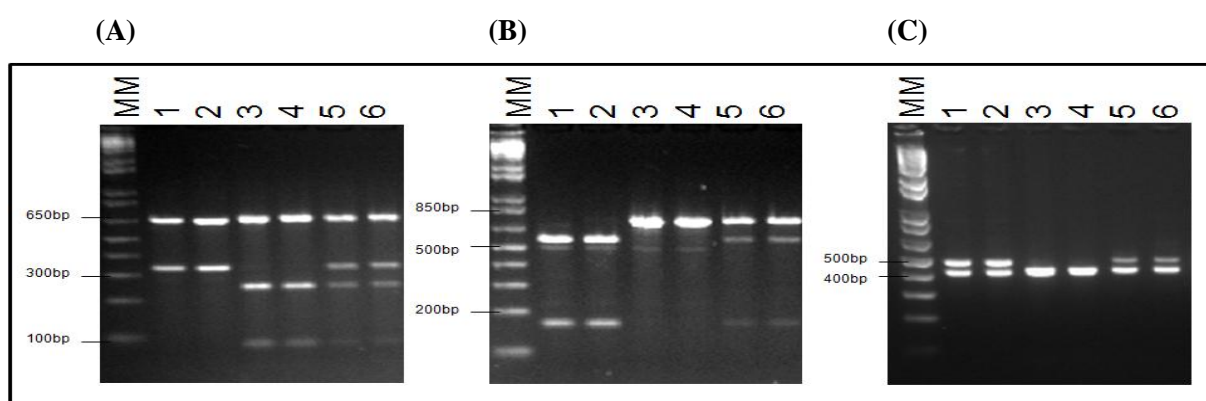


Figura 15 (A): padrão de marcadores gerado pelo primer Aps-1; (B): padrão de marcadores gerados pelo primer REX-1 e (C): padrão de marcadores gerado pelo primer JB-1. Linhas 1 & 2 = indivíduos homozigotos resistentes (*Ty-1/Ty-1*); Linhas 3 & 4 = indivíduos homozigotos suscetíveis (*ty-1/ty-1*); Linhas 5 & 6 = indivíduos heterozigotos (*Ty-1/ty-1*). Análise em gel de agarose 1,5%. MM = Marcador Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.6. Mapa físico dos marcadores no Cromossomo 6.

De acordo com a análise da sequência e ancoragem física no genoma do tomateiro (www.solgenomics.net/tools/blast/index.pl), o marcador SCAR-C19 está localizado na região compreendida entre as posições 1.930.690 pb – 1.931.424 pb no topo do cromossomo 6 do tomateiro, estando localizado entre os primers CAPS UW-Ty-1 e JB-1. O SCAR R4 está na posição 4.053.086 também no topo do cromossomo 6, abaixo do primer REX-1 (Figura 16). Os demais marcadores estão sendo sequenciados e quando as sequências estiverem disponíveis serão também ancorados ao genoma referência do tomateiro.

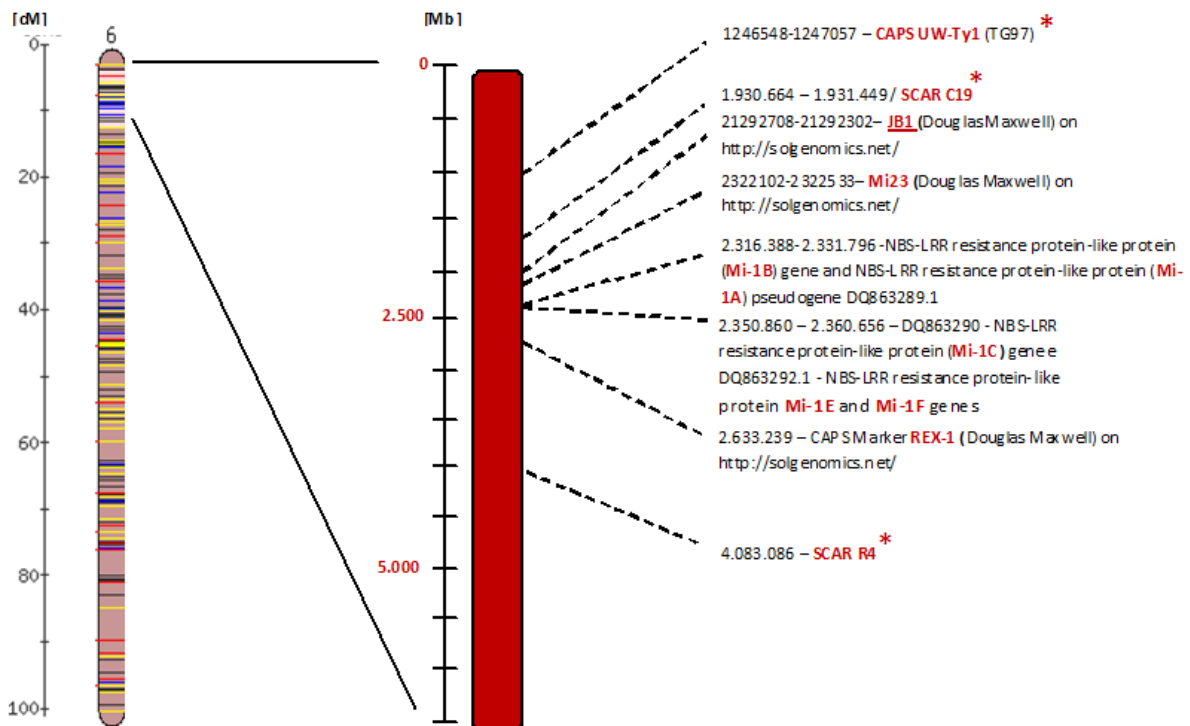


Figura 16. Mapa físico do cromossomo 6, mostrando marcadores que estão ancorados no topo do cromossomo, segundo genoma do tomateiro disponível no SolGenomics (www.solgenomics.net/tools/blast/index.pl).

4. DISCUSSÃO

As quatro linhagens parentais de populações experimentais segregantes foram avaliadas inicialmente com uma coleção de 520 *primers* RAPD. Seis *primers* foram selecionados capazes de gerar polimorfismos exclusivamente para a **população #1** (OPC-08, OPC-19, OPK-13, OPO-05, OPO-15 e OPT-01). Quatorze *primers* foram exclusivamente polimórficos para a **população #2** (OP-A16, OPB-12, OPB-20, OPD-03, OPF-19, OPH-19, OPI-06, OPO-20, OPP-05, OPP-09, OPQ-04, OPQ-11, OPQ-19 e OPT-18). Nove *primers* (OPF-13, OPG-12, OPH-07, OPH-15, OPK-08, OPM-06, OPM-11, OPR-04, OPS-02), foram capazes de detectar polimorfismos nas **duas populações**. Destes, os *primers* OPM-11 e OPR-04 foram os que apresentaram polimorfismos altamente estáveis para 96 indivíduos da população #1.

Como já estabelecido na literatura, a reprodutibilidade dos resultados de amplificação por marcadores RAPD requer uma otimização e estrito controle das condições de reação, juntamente com a concentração de DNA. A concentração de magnésio, enzima DNA polimerase, temperatura de anelamento e qualidade da agarose, também podem afetar o número de amplificações bem como, sua intensidade e separação (Gostimski *et al.*, 1999).

O desempenho dos marcadores SCAR foi avaliado variando a temperatura de anelamento e concentração de magnésio, até chegar a um protocolo e mix de reação de PCR que amplificasse o produto esperado de maneira estável. O primer SCAR OP-M11 produziu um polimorfismo de intensidade, contudo ainda com baixa estabilidade. A razão para amplificação de DNA com intensidades diferentes não é bem conhecida, pode ser que os *primers* avaliados não se anelaram perfeitamente ao DNA molde em todos os ciclos da PCR, amplificando eficientemente em apenas alguns ciclos, gerando amplicons de diferentes intensidades (Bardakci, 2001). O marcador gerado pelo SCAR-O5 é dominante e é, aparentemente, derivado de um segmento cromossômico introgridido de *S. chilense*, pois está localizado no cromossomo 6 do tomateiro.

Uma característica peculiar do marcador gerado pelo *primer* SCAR-C19, é a presença em indivíduos heterozigotos de uma banda distinta, não parental e de migração mais lenta no gel, em relação às bandas parentais, conhecida como heteroduplex. Em trabalho realizado por Davis *et al.* (1995), foram identificados dois padrões de bandas heteroduplex em indivíduos heterozigotos. Em alguns casos, somando-se a banda não parental à banda parental lenta e a parental rápida, eram, por vezes, de mobilidade suficientemente diferente a ser claramente distinguíveis em heterozigotos, resultando em um marcador com o fenótipo característico de três bandas. Em outros casos, as bandas parentais apresentaram mobilidades no gel tão parecidas, a ponto de se ‘enovelarem’ em uma única banda em indivíduos heterozigotos, resultando em um fenótipo de duas bandas para estes indivíduos.

A presença de bandas heteroduplex representa uma ferramenta diagnóstica de codominância em geral (Davis *et al.*, 1995). No presente trabalho, as bandas não parentais e parentais foram clonadas, a fim de confirmar sua relação e o alinhamento das sequências revelou uma completa identidade entre bandas parentais e não parentais. O SCAR-C19 apresentou-se a uma distância genética equivalente a do marcador CAPS descrito por Maxwell (2006), porém com uma considerável distância física de acordo com o mapa físico disponível no Tomato-EXPEN 2000 – SolGenomics. A não correspondência entre distância física e distância genética tem sido observada em algumas regiões do genoma do tomateiro (Zamir *et al.*, 1994). Essa situação ocorre também na região do cromossomo 6 onde o está localizado o locus *Ty-1*. Nessa região observa-se a presença de um grande número de marcadores geneticamente ligados, pois corresponde a uma região do genoma que não ocorre recombinação (Verlaan *et al.*, 2011). Essa supressão de recombinação faz com que o segmento de introgressão de *S. chilense* contendo o locus *Ty-1* (que compreende milhões de pares de base) seja herdado virtualmente intacto de geração em geração.

A disponibilidade de marcadores moleculares ligados a genes de interesse aumenta de

maneira considerável a eficiência dos programas de melhoramento genético. Muitos genes de resistência, identificados em várias espécies selvagens, têm sido introgrididos no tomateiro cultivado. Uma característica interessante desses fatores de resistência (alguns deles mapeados no cromossomo 6) é que eles se localizam em agrupamentos (clusters), sendo geneticamente bem próximos. A identificação de um marcador associado especificamente a um desses genes de resistência pode ser bastante complicada. Em geral, as linhagens de melhoramento incorporam vários genes oriundos de diferentes acessos/espécies selvagens e estas, podem, por exemplo, compartilhar um só marcador para diferentes variantes alélicas e, conseqüentemente, levar a resultados falso-positivos (de Castro *et al.*, 2007). Neste aspecto, os marcadores em ligação extrema com o alelo de interesse, ou ainda melhor, um marcador derivado do próprio gene de interesse (= marcador funcional) apresentam claras vantagens.

4.1. O mapeamento genético e físico dos marcadores ligados ao locus *Ty-1*

O locus *Ty-1* está localizado em um “hot-spot” de genes de resistência onde também residem importantes genes/fatores de resistência a diferentes patógenos tais como *Alfafa mosaic virus* – gene *Am* (Parrella *et al.*, 2004), *Oidium neolycopersici* – gene *OI-1* (Huang *et al.*, 2000), *Cladosporium fulvum* – gene *Cf-4* (Thomas *et al.*, 1997), *Ralstonia solanacearum* (Wang *et al.*, 2000) e *Meloidogyne* spp. – gene *Mi-1* (Sean *et al.*, 2007). A posição exata do locus *Ty-1* ainda não é conhecida. O mapeamento preciso deste locus tem sido dificultado devido a inversões entre segmentos cromossômicos de *S. lycopersicum* e *S. chilense* ‘LA-1969’, o que interrompe o pareamento cromossômico durante a meiose (Verlaan *et al.*, 2011), suprimindo a recombinação gênica e dificultando a redução do tamanho da introgressão de material selvagem durante o processo de melhoramento do tomateiro cultivado. O locus *Ty-1* foi inicialmente mapeado por Zamir *et al.* (1994) no cromossomo 6 entre os marcadores TG297 (4.0 cM Tomato-EXPEN 2000 e 6.0 cM Tomato-EXPEN 1992) e TG97 (8.6 cM

Tomato-EXPEN 1992), próximo à região do centrômero, intimamente ligado (<1 cM) ao alelo *Mi*, que confere resistência ao nematóide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), porém em fase de repulsão. Estudos posteriores, com novos marcadores moleculares fortemente ligados ao *Ty-1*, apresentaram resultados contraditórios quanto à posição genética/física do locus. Estudos realizados por Milo (2001), constataram que o *Ty-1* estava ligado ao locus REX-1, em um “cluster” formado pelo gene *Mi*, sugerindo que o *Ty-1* está localizado no braço curto do cromossomo 6. Em outro estudo, de Castro *et al.* (2007) relatou uma ligação com o marcador CT21, localizado abaixo do centrômero no braço longo do cromossomo 6. Este marcador CT21 é um RFLP (“restriction fragment length polymorphism”) do qual foi originado/desenhado um marcador CAPS: o JB-1, utilizado neste trabalho para análise de alguns recombinantes. A região contendo o marcador JB-1 não tem sido introgridida em *S. lycopersicum* com o gene *Mi*, portanto a presença deste gene não interfere com os resultados em relação ao mapeamento do locus *Ty-1*, (de Castro *et al.*, 2007), entretanto é um marcador dominante, não sendo apto a diferenciar heterozigotos. O locus 1 da fosfatase ácida (*Asp-1*) foi a primeira isoenzima empregada como marcador para o gene *Mi*. Através do sequenciamento deste locus (Williamson & Colwell, 1991) foi possível desenvolver um marcador baseado em PCR. Para linhagens que contém o gene *Ty-1*, os alelos para este gene coincidem com os alelos de plantas que contém o gene *Mi*, ou seja, *S. peruvianum* e *S. chilense* tem o mesmo alelo para este marcador. Isto pode levar a resultados falso-positivos, portanto a utilização do *Asp-1* como marcador não é muito útil (de Castro *et al.*, 2007).

Em estudos conduzidos por Verlaan *et al.* (2011; 2013), utilizando uma técnica de BAC-FISH e um “screening” em larga escala de recombinantes, para analisar a estrutura cromossômica e o comportamento da recombinação na região onde o *Ty-1* está introgridido, foi demonstrado que o gene *Ty-1* está localizado no braço longo do cromossomo 6 do tomateiro, próximo ao locus *Ty-3*, podendo até mesmo ser alélicos. Ji *et al.* (2007) já haviam

mapeado o locus *Ty-3* no braço longo do cromossomo 6, utilizando duas populações F_2 segregantes. Por causa da supressão da recombinação, a associação da resistência conferida pelo locus *Ty-1* com marcadores no braço curto do cromossomo 6 (como o REX-1 – Milo, 2001), não foi menos acurada que o mapeamento desse locus próximo de marcadores no braço longo (como o CT-21/JB-1 – de Castro *et al.*, 2007; Verlaan *et al.*, 2011). O mapeamento de genes na região próxima ao centrômero é dificultado pela supressão da recombinação. Um exemplo é o mapeamento do *Mi*, localizado em uma região centromérica, onde supressão da recombinação foi relatada em populações F_2 derivadas de cruzamentos interespecíficos entre *S. lycopersicum* e *S. peruvianum*, que foram usados para clonagem do gene *Mi* (Kaloshian *et al.*, 1998).

No presente trabalho, para que a ancoragem dos marcadores RAPD fosse conduzida de maneira confiável, foi necessário, a princípio, uma genotipagem do locus *Ty-1* na população #1 ('LAM 144-R' x 'LAM 144-S') com marcadores CAPS codominantes em estreita ligação com um segmento do cromossomo 6 onde esse fator de resistência está posicionado (Zamir *et al.*, 1994). O uso de linhagens isogênicas contrastantes para essa região do genoma também permitiu aumentar a eficiência e enriquecer a coleção de marcadores RAPD/SCAR ligado exclusivamente com esse segmento cromossomal. A partir de um dos marcadores RAPD identificados em ligação com o locus *Ty-1* (OPC-19) foi possível desenvolver um marcador do tipo SCAR robusto, estável e codominante, que está geneticamente próximo do locus *Ty-1*. De acordo com a análise na população #1, o SCAR-C19 e o marcador CAPS UW*Ty-1* (Maxwell *et al.*, 2006) estão a 2,21 cM, o que significa que esse marcador SCAR poderá ser tão útil quanto o marcador CAPS em trabalhos de seleção assistida.

No melhoramento genético é sempre interessante que se tenha em uma mesma linhagem/cultivar vários genes de resistência piramidizados, Chen *et al.* (2012)

desenvolveram uma técnica de PCR multiplex usando os primers JB-1 e Mi, que estão fortemente ligados ao gene de resistência *Ty-1*, podendo identificar simultaneamente resistência tanto aos begomovírus quanto aos nematóides-das-galhas. Nesse sentido, a coleção de marcadores que estão sabidamente ligados repulsão (também denominada na literatura como configuração TRANS) com genes de interesse podem ser utilizados como ferramentas para identificar raros recombinantes em que os genes de interesse tenham adquirido uma configuração CIS (em associação). A identificação desses recombinantes é de extremo valor uma vez que os dois genes de interesse vão estar sempre presentes nos gametas formados por esse indivíduo recombinante (Boiteux *et al.*, 2012).

5. CONCLUSÕES

- A busca de marcadores RAPD polimórficos usando linhagens isogênicas contrastantes para resistência ao ToSRV se mostrou uma estratégia eficiente em revelar marcadores associados apenas com a região contendo o locus *Ty-1*.
- Seis *primers* (OPC-08, OPC-19, OPK-13, OPO-05, OPO-15 e OPT-01) foram selecionados capazes de gerar polimorfismos exclusivamente para população #1.
- Quatorze *primers* (OPA-16, OPB-12, OPB-20, OPD-03, OPF-19, OPH-19, OPI-06, OPO-20, OPP-05, OPP-09, OPQ-04, OPQ-11, OPQ-19 e OPT-18) foram selecionados exclusivamente para população #2.
- Nove *primers* (OPF-13, OPG-12, OPH-07, OPH-15, OPK-08, OPM-06, OPM-11, OPR-04, OPS-02) foram capazes de detectar polimorfismos nas duas populações.
- Os padrões distintos de polimorfismo indicam que as linhagens resistentes são derivadas de dois eventos distintos de introgressão, muito provavelmente de diferentes acessos de *S. chilense*.
- O amplicon de 800 pb do RAPD OPC-19 gerou o marcador SCAR C-19 que se

mostrou mais estável e robusto, sendo recomendado para uso em sistemas de seleção assistida do locus *Ty-1*.

- A universalidade do polimorfismo gerado pelo marcador SCAR C-19 foi demonstrado em uma terceira população contendo o gene recessivo *tcm-1* que também foi localizado na mesma região genômica do locus *Ty-1* (Dissertação Mariana Machado 2013, dados ainda não publicados).
- O marcador SCAR C-19 apresenta a desejável característica de codominância, sendo mais econômico e fácil de usar do que outros marcadores do tipo CAPS, uma vez que não existe a necessidade de clivagem com enzima de restrição.
- A localização genética do marcador SCAR C-19 foi estimada em 2,21 cM, a mesma do marcador CAPS gerado pelo par de *primers* UW Ty -1R/ UW Ty -1F (Maxwell *et al.*, 2006), que tem sido um dos mais amplamente utilizados em programas de seleção assistida do tomateiro.
- A disponibilidade do genoma completo do tomateiro permitiu ancorar um grande número de marcadores RAPD e SCAR desenvolvidos no presente trabalho, incluindo o marcador SCAR C-19. A localização física desses marcadores indicou que a grande maioria está localizada no cromossomo 6 adjacentes ao locus *Ty-1*.
- Os novos marcadores RAPD/SCAR podem ser muito úteis em trabalhos de monitoramento da incorporação do locus *Ty-1* em uma ampla gama de acessos de tomateiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEX, C.F. 1999. Computational Methods for Fast and Accurate DNA Fragment Assembly. Ph.D. Thesis. Wisconsin, Madison: University of Wisconsin.
- BARDAKCI, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Turkish Journal of Biology 25: 185–196.
- BIAN, X.Y.; THOMAS, M.R.; RASHEED, M.S.; SAEED, M.; HANSON, P.; DE BARRO, P.J.; REZAIAN, M.A. 2007. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. Phytopathology 97:

930–937.

- BOITEUX L.S.; FONSECA M.E.N.; SIMON P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32–38.
- BOITEUX L.S.; FONSECA M.E.N.; VIEIRA, J.V.; Pereira-Carvalho, R.C. 2012. Breeding for Resistance to Viral Diseases. In: Fritsche-Neto, R.; Borém, A. (Org.). *Plant Breeding for Biotic Stress Resistance*. 1ed. Berlin - Heidelberg: Springer – Verlag, v. 1, p. 57–79.
- BOITEUX, L.S.; OLIVEIRA V.R.; SILVA C.H.; MAKISHIMA, N.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; GIORDANO L.B. 2007a. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite *Begomovirus* species. *Horticultura Brasileira* 25: 20–23.
- BOITEUX, L.S.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. 2007b. Reação de acessos de tomateiro portando o gene *Ty-2* (introgredido de *Solanum habrochaites* f. *glabratum*) a um isolado de begomovírus de genoma bipartido. *Horticultura Brasileira* 25: S97.
- BRAUNER S.; CRAWFORD D.J.; STUESSY, T.F. 1992. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *American Journal of Botany* 79: 1436–1439.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9: 553–557.
- CHAGUE, V.; MERCIER, J.C.; GUENARD, M.; DE-COURCEL, A.; VEDEL, F. 1996. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 92 (8): 1045–1051.
- CHAGUE, V.; MERCIER, J.C.; GUENARD, M.; DE-COURCEL, A.; VEDEL, F. 1997. Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 671–677.
- CHEN, S.X.; DU, J.N.; HAO, L.N.; WANG, C.Y.; CHEN, Q.; CHANG, Y.X. 2012. Identification of markers tightly linked to Tomato yellow leaf curl disease and root-knot nematode resistance by multiplex PCR. *Genetics and Molecular Research* 11(3): 2917–2928.
- CHUNWONGSE, J.; BUNN, T.B.; CROSSMAN, C.; JIANG, J.; TANKSLEY, S.D. 1994. Chromosomal localization and molecular-marker tagging of the powdery mildew resistance gene (*Lv*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 76–79.
- COLLARD B.C.Y., JAHUFER M.Z.Z., BROUWER J.B.; PANG E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- DAVIS, T.M.; YU, H.; HAIGIS, K.M.; MCGOWAN, P.J. 1995. Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 582–588.
- DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M.; DINSDALE, A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annual Review of Entomology* 56: 1–19.
- DE CASTRO, A.P.; BLANCA, J.M.; DÍEZ, M.J.; VINALS, F.N. 2007. Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *European Journal of Plant Pathology* 117: 347–356.
- DE CASTRO, A.P.; JULIÁN, O.; DÍEZ, M.J. 2012. Genetic control and mapping of *Solanum chilense* LA1932, LA1960 and LA1971-derived resistance to Tomato yellow leaf curl

- disease. *Euphytica* 10.1007/s10681-012-0792-z.
- DOGANLAR, S.; DODSON, J.; GABOR, B.; BECK-BUNN, T.; CROSSMAN, C.; TANKSLEY, S.D. 1998. Molecular mapping of the *py-1* gene for resistance to corky root rot (*Pyrenochaeta lycopersici*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 784–788.
- FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M.F.; ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153: 783–821.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Brasília: Embrapa Cenargen, p.220.
- GANAL, M.W.; SIMON, R.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; ARNDT, M.; PHILLIPS, M.S.; TANKSLEY, S.D.; KUMAR, A. 1995. Genetic mapping of a wide spectrum nematode resistance gene (*Hero*) against *Globodera rostochiensis* in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 886–891.
- GARCÍA-CANO, E.; RESENDE, R.O.; BOITEUX L.S.; GIORDANO L.B.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. 2008. Phenotypic expression, stability and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology* 98: 618–627.
- GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; BOITEUX, L.S. 2005a. Efeito da infecção precoce de Begomovírus com genoma bipartido em características de fruto de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* 23: 815–818.
- GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA F.M.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX L.S. 2005b. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. ‘Tyking’. *Euphytica* 143: 27–33.
- GOTMISKY, S.A.; KOKAEVA, Z.G.; BOBROVA, V.K. 1999. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. *Research Journal of Genetics* 11: 1538–1549.
- HANSON P.; GREEN S.K.; KUO G. 2006. *Ty-2*, a gene in chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetics Cooperative Report* 56: 17–18.
- HUANG, C.C., CUI, Y.Y., WENG, C.R., ZABEL, P., LINDHOUT, P. 2000. Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene *Ol-1* on chromosome 6 of tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 101:918–924.
- HUTTON S.F.; SCOTT J.W.; SCHUSTER D.J. 2012. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4. *HortScience* 47: 324–327.
- JI, Y.; SCHUSTER, D.J.; SCOTT, J.W. 2007. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20: 271–284.
- KANG, N.J.; JOUNG, J.I.; SHON, Y.G.; JUNG, HB; CHO, Y.S.; KIM, H.T. 2002. Identification of randomly amplified polymorphic DNA markers linked to the gene for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (race 1) in tomato. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 43: 545–548.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.; LINCOLN, S.; NEWBURG, L. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174 –181
- LAPIDOT, M.; BEN-JOSEPH, R.; COHEN, L. 2006. Development of a scale for evaluation of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance level in tomato plants. *Phytopathology* 96: 1404–1408.

- MELO, P.C.T.; MELO, A.M.T.; BOITEUX, L.S. 2009. Overview and perspectives of tomato breeding for fresh market adapted to mild tropical climates of Brazil. *Acta Horticulturae* 821: 55–62.
- MESSEGUER, G.; GANAL, M.; VICENTE, M.C.; YOUNG, N.D.; BOLKAN, H.; TANKSLEY, S.D. 1991. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 529–536.
- MILO, J. 2001. The PCR-based marker REX-1, linked to the gene *Mi*, can be used as a marker to TYLCV tolerance. Tomato Breeders Roundtable. [http:// www.oardc.ohio-state.edu/tomato/TBRT%202001%20Abstracts.pdf](http://www.oardc.ohio-state.edu/tomato/TBRT%202001%20Abstracts.pdf).
- NAVAS-CASTILLO J, FIALLO-OLIVÉ E, SÁNCHEZ-CAMPOS S, 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49: 219–248.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985–993.
- PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2009. Expressão fenotípica e mecanismos de ação de genes envolvidos na resistência ampla de Begomovírus monopartidos e bipartidos em tomate. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- PEREIRA-CARVALHO, R.C.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; DÍAZ-PENDON, J.A.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; CHARCHAR, J.M.; RESENDE, R.O. 2010. Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite Begomovirus spp. in wild *Solanum (Lycopersicon)* accessions. *Plant Disease* 94: 179–185.
- PILLEN, K.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. 1996. Construction of a high-resolution genetic map and YAC-contigs in the tomato *Tm-2a* region. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 228–233.
- SANTANA, F.M.; RIBEIRO, S.G.; MOITA, A.W.; MOREIRA JÚNIOR, D.J.; GIORDANO, L.B. 2001. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122:45-51.
- SILVA, M.V.; SANTOS, J.B. 2001. Identificação de marcador RAPD ligado ao alelo *Co-4* de resistência do feijoeiro comum ao agente causal da antracnose. *Ciência Agrotecnologia* 25: 1097–1104.
- STEVENS, M.R.; LAMB, E.M.; RHOADS, D.D. 1995. Mapping the *Sw-5* locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 90 (3-4): 451–456.
- THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641.
- VAN-DER-BEEK, J.G.; PET, G.; LINDHOUT, P. 1994. Resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon hirsutum* is controlled by an incompletely-dominant gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theoretical and Applied Genetics* 89 (4): 467–473.
- VERLAAN, M.G.; SZINAY, D.; HUTTON, S.F.; JONG, H.; KORMELINK, R.; VISSER, R.G.F.; SCOTT, J.W.; BAI, Y. 2011. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. *The Plant Journal* 68: 1093–1103.
- VERLAAN, M. G.; HUTTON, S. F.; IBRAHEM, R. M.; KORMELINK, R.; VISSER, R. G.; SCOTT, J. W.; EDWARDS JD; BAI, Y. 2013. The *Tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genetics* 9 (3): e1003399.
- VIGNAL A, MILAN D, SANCRISTOBAL M, EGGEN A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34: 275–

- WELSH, J & MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, A. R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- WILLIAMSON, V. M., & COLWELL, G. 1991. Acid phosphatase-1 from nematode resistant tomato: Isolation and characterization of its gene. *Plant Physiology* 97: 131-146.
- WILLIAMSON, V. M., HO, J. Y., WU, F. F., MILLER, N., & KALOSHIAN, I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 757-763.
- WILLIAMS, C.E.; St. CLAIR, D.A. 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome* 36: 619-630.
- YAGHOUBI, J.; KALOSHIAN, I.; WEN, Y.; WILLIAMSON, V.M. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 457-464.
- ZAMIR D., EKSTEIN-MICHELSON I., ZAKAY Y., NAVOT N., ZEIDAN M., SARFATTI M., ESHED Y., HAREL E., PLEBAN T., VANOSS H., KEDAR N., RABINOWITCH H.D., CZOSNEK H. 1994. Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 141-146.
- ZAKAY, Y.; NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; KEDAR, N.; RABINOWITCH, H.; CZOSNEK, H.; ZAMIR, D. 1991. Screening of *Lycopersicon* accessions for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease* 72: 279-281.
- ZHOU, Y.C.; NOUSSOUROU, M.; KON, T.; ROJAS, M.R.; JIANG, H.; CHEN, L.F.; GAMBY, K.; FOSTER, R.; GILBERTSON, R.L. 2008. 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* 153: 693-703.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho dão suporte aos programas de melhoramento do tomateiro, visando resistência aos begomovírus no Brasil. O gene/locus *Ty-1*, mostrou-se eficiente em alta densidade de infestação de moscas-brancas virulíferas infectadas com *Tomato severe rugose virus*, obtendo melhores resultados quando presente em dupla dosagem. As notas de plantas contendo o alelo/locus de resistência em dupla dosagem foram significativamente mais baixas do que as que continham apenas um único alelo/locus e as notas destas foram significativamente mais baixas do que plantas com nenhuma cópia do alelo/locus. Esses resultados indicam aos programas de melhoramento que para obter híbridos com uma melhor expressão fenotípica da tolerância/resistência ao ToSRV deve-se, sempre que possível, utilizar as duas linhagens parentais com o alelo dominante *Ty-1* em homozigose.

Na busca por marcadores moleculares ligados ao gene *Ty-1*, foi possível desenvolver dois SCARs estáveis: o SCAR O-05 com característica dominante e o SCAR C-19 com característica codominante. Este último mostrou-se o mais estável e robusto, estando localizado geneticamente a 2,21cM e sendo recomendado para uso em sistemas de seleção assistida do locus *Ty-1*. A universalidade do polimorfismo gerado pelo marcador SCAR C-19 foi demonstrada em uma terceira população contendo o gene recessivo *tcm-1*, que também foi localizado na mesma região genômica do locus *Ty-1*. A disponibilidade do genoma completo do tomateiro permitiu ancorar um grande número de marcadores RAPD e SCAR desenvolvidos no presente trabalho e a localização física desses marcadores indicou que a grande maioria está localizada no cromossomo 6, adjacentes ao locus *Ty-1*. O conjunto de marcadores gerados pode representar uma importante ferramenta em programas de seleção assistida visando monitorar a incorporação do gene *Ty-1*.