

Notas Científicas

Identificação dos genes *Ty-2* e *Ty-3* de resistência a begomovírus em genótipos de tomateiro

Jorge González Aguilera⁽¹⁾, Francisco Dueñas Hurtado⁽²⁾, Cesar Augusto Diniz Xavier⁽³⁾, Bruno Soares Laurindo⁽⁴⁾, Carlos Nick⁽⁴⁾, Marta Álvarez Gil⁽²⁾, Derly José Henriques da Silva⁽⁴⁾ e Francisco Murilo Zerbini⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Genética e Melhoramento, Avenida P.H. Rolfs, s/nº, CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: j51173@yahoo.com ⁽²⁾Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba. E-mail: franko@inca.edu.cu, malvarez@inca.edu.cu ⁽³⁾UFV, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, Bioagro. E-mail: cesar.xavier@ufv.br, zerbini@ufv.br ⁽⁴⁾UFV, Departamento de Fitotecnia. E-mail: brunoslaurindo@yahoo.com.br, karlnickbr@yahoo.com.br, derly@ufv.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi identificar a presença dos genes *Ty-2* e *Ty-3*, de resistência a begomovírus, em acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa. Os oligonucleotídeos TO302 F/R e FLUW25 F/R foram utilizados em reações de PCR, para verificar a presença de marcadores relacionados aos genes *Ty-2* e *Ty-3*, respectivamente. Observou-se a presença do gene *Ty-2*, em heterozigose na subamostra BGH-6881 (*Solanum peruvianum*), e do gene *Ty-3*, em homozigose nas subamostras BGH-6878, BGH-6897 (*S. lycopersicum*) e em heterozigose na subamostra BGH-6881. A identificação dos genes de resistência, com reações de PCR, representa um avanço para os programas de melhoramento de tomateiro no Brasil.

Termos para indexação: *Solanum lycopersicum*, *Solanum peruvianum*, geminivírus, PCR, recursos genéticos.

Identification of the begomovirus resistance genes *Ty-2* and *Ty-3* in tomato genotypes

Abstract – The objective of this work was to identify the presence of the genes begomovirus resistance *Ty-2* and *Ty-3* in tomato accessions of the Banco de Germoplasma de Hortaliças of the Universidade Federal de Viçosa. The oligonucleotides TO302 F/R and FLUW25 F/R were used in PCR analysis to verify the presence of markers associated to the genes *Ty-2* and *Ty-3*, respectively. The *Ty-2* gene was observed in heterozygosis in the accession BGH-6881 (*Solanum peruvianum*), and the *Ty-3* gene in homozygosis in the accessions BGH-6878, BGH-6897 (*S. lycopersicum*), and in heterozygosis in accession BGH-6881. The identification of resistance genes, using PCR analysis, represents an advance for tomato breeding programs in Brazil.

Index terms: *Solanum lycopersicum*, *Solanum peruvianum*, geminivirus, PCR, genetic resources.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes atualmente, por fazer parte do hábito alimentar de grande parte da população mundial.

A cultura do tomateiro é suscetível a uma ampla gama de fatores bióticos e abióticos que influenciam negativamente a sua produtividade, o que tem sido favorecido pelo processo de domesticação da espécie ao longo dos anos (Vidavsky et al., 1998). Entre os fatores bióticos, mais de 200 agentes fitopatogênicos de origem fúngica, bacteriana e viral foram reportados para a cultura (Foolad, 2007). Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), transmitidos pela mosca-branca, *Bemisia tabaci*, são alguns dos patógenos que causam as maiores perdas no campo (Pérez de Castro et al., 2007).

Considerando-se a vulnerabilidade dos genótipos cultivados e a ocorrência de novas espécies de begomovírus no campo (Ambrozevicus et al., 2002; Ribeiro et al., 2003; Castillo-Urquiza et al., 2008), uma das alternativas mais duradouras e eficientes de manejo consiste na procura e na introgressão de genes de resistência a begomovírus, em espécies silvestres pertencentes ao gênero *Solanum* (González-Cabezuelo et al., 2007).

As variedades disponíveis no mercado brasileiro são portadoras, principalmente, do gene *Ty-1*, que confere resistência ao *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um begomovírus com genoma monosssegmentado que não ocorre no Brasil (classificado como praga quarentenária A1). O TYLCV é o begomovírus mais agressivo ao tomateiro, em todas as regiões onde ocorre, daí a importância de se incorporar fontes de resistência

nas variedades e nos híbridos disponíveis no mercado brasileiro (Santana et al., 2001). Além disso, o gene *Ty-1* oferece resistência ou tolerância aos vírus com genoma bissegmentado, predominantes no Brasil.

A busca de novas fontes ou genes de resistência levou à descoberta e à introgressão dos genes *Ty-2* e *Ty-3*, localizados nos cromossomos 11 e 6 das espécies selvagens *S. habrochaites* e *S. chilense*, respectivamente. Como o *Ty-1*, esses genes conferem resistência a diferentes isolados de TYLCV (Hanson et al., 2006; Ji et al., 2007).

A busca por esse tipo de gene em acessos presentes nos bancos de germoplasma do Brasil e a sua introgressão em genótipos comerciais podem contribuir para melhor controle de begomovirose no campo, nas condições brasileiras.

O objetivo deste trabalho foi identificar a presença dos genes *Ty-2* e *Ty-3* resistentes a begomovírus, em acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças (2010) da Universidade Federal de Viçosa.

Foram avaliados 78 acessos (Tabela 1). As variedades Santa Clara e Campbell 28 e os híbridos Débora e Fany foram utilizados como padrões negativos (ausência dos genes *Ty-2* e *Ty-3*). As linhagens H24 e LD7, portadoras do gene *Ty-2*, e a linhagem STY4, portadora do gene *Ty-3*, cujas sementes foram doadas pelo Instituto Nacional de Ciências Agrícolas de Cuba, foram utilizadas como padrões positivos. As mudas foram cultivadas em bandejas até os 25 dias após a germinação e transplantadas para vasos de plástico de 1 L de capacidade, preenchidos com terriço de barranco e esterco bovino (2:1) previamente esterilizado.

Três plantas de cada subamostra foram mantidas em condições de casa de vegetação, com temperatura de aproximadamente $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa entre 80 e 85%. As plantas foram mantidas sob essas condições até o momento da coleta das folhas, no estágio de quatro folhas verdadeiras. O DNA foi extraído pelo método de Dellaporta et al. (1983), e a sua concentração foi ajustada para $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$.

Para a identificação dos genes, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para os genes *Ty-2* e *Ty-3*, descritos por Hanson et al. (2006) e Ji et al. (2007), respectivamente (Tabela 2).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de $25\text{ }\mu\text{L}$, tendo-se utilizado $2,5\text{ }\mu\text{L}$ de tampão $10\times$ (100 mmol L^{-1} Tris-HCl, 500 mmol L^{-1} KCl, pH 9,0), $1,5\text{ mmol L}^{-1}$ de MgCl_2 , $2,5\text{ mmol L}^{-1}$ de cada dNTP, $2,5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada oligonucleotídeo e 1 U de *Taq* DNA

polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP). As condições de reação e a quantidade de DNA molde foram diferentes para cada par de oligonucleotídeos. Para as reações com o par TO302 F/R (amplificação correspondente ao gene *Ty-2*) (Tabela 2), foram utilizados 100 ng de DNA, e as condições de amplificação consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C , durante 5 min, seguida por 35 ciclos – desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min – e finalização com extensão a 72°C por 10 min. Para as reações com o par FLUW25 F/R (amplificação correspondente ao gene *Ty-3*), foram utilizados 15 ng de DNA, e as condições de amplificação consistiram de etapa inicial de desnaturação a 94°C , durante 3 min, seguida por 35 ciclos – desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 53°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min – e finalização com extensão a 72°C por 10 min.

Os produtos obtidos nas reações de PCR foram analisados em géis de agarose a 1,5%, tendo-se utilizado o marcador 1 kb Plus DNALadder (Invitrogen, São Paulo, SP). Os genótipos foram classificados em homozigotos, dominantes ou recessivos, e heterozigotos, com base nos padrões de amplificação observados.

A análise das reações de amplificação para o gene *Ty-2* indicou que, dos 78 acessos avaliados, apenas a subamostra BGH-6881 (*S. peruvianum*) apresentou o padrão heterozigoto (*Ty-2/ty-2*) (Tabela 1). Esse padrão inclui dois fragmentos: um de aproximadamente 950 pb, correspondente ao alelo resistente *Ty-2*, igual ao amplificado a partir dos acessos H24 e LD7, utilizados como controles positivos; e outro de aproximadamente 850 pb, correspondente ao alelo suscetível *Ty-2*, amplificado a partir dos controles negativos e dos demais acessos.

Dueñas et al. (2008) observaram que, sob condições de infecção não controlada – livre escolha em condições de campo e sem manejo do inseto vetor –, na presença do isolado cubano TYLCV-IL [CU], os acessos H24 e CLN2116B apresentaram comportamento de resistência, com ausência dos sintomas característicos do vírus e sem replicação viral. De acordo com os autores, esse comportamento pode ser atribuído à presença do gene *Ty-2*. A identificação deste gene em acessos no Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV) representa uma nova opção para os programas de melhoramento de tomateiro no Brasil. A introgressão em novos genótipos pode resultar em comportamento similar ao verificado por Dueñas et al. (2008), embora

deva ser testada nas condições brasileiras frente aos begomovírus bissegmentados.

A análise dos padrões de amplificação para o gene *Ty-3* indicou que os acessos BGH-6878 e BGH-6897,

ambos de *S. lycopersicum*, apresentaram padrão homocigoto dominante (*Ty-3/Ty-3*) (Tabela 1), com amplificação de um fragmento de aproximadamente 640 pb, idêntico ao amplificado para o genótipo

Tabela 1. Lista dos códigos, das espécies e dos genes identificados nas subamostras de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa, utilizados no experimento⁽¹⁾.

Número	Código	Espécie	Genes		Número	Código	Espécie	Genes	
			<i>Ty-2</i>	<i>Ty-3</i>				<i>Ty-2</i>	<i>Ty-3</i>
1	BGH-2087	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	44	BGH-2129	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
2	BGH-2088	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	45	BGH-2130	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
3	BGH-2089	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	46	BGH-2152	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
4	BGH-2091	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	47	BGH-2144	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
5	BGH-2092	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	48	BGH-2145	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
6	BGH-2093	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	49	BGH-2146	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
7	BGH-2095	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	50	BGH-6858	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
8	BGH-2096	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	51	BGH-6859	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
9	BGH-2097	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	52	BGH-6861	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
10	BGH-2098	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	53	BGH-6866	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
11	BGH-2100	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	54	BGH-6867	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
12	BGH-2102	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	55	BGH-6877	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
13	BGH-2105	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	56	BGH-6878	<i>S. lycopersicum</i>	-	+
14	BGH-2109	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	57	BGH-6880	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
15	BGH-2110	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	58	BGH-6881	<i>S. peruvianum</i>	±	±
16	BGH-2111	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	59	BGH-6884	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
17	BGH-2115	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	60	BGH-6887	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
18	BGH-2116	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	61	BGH-6897	<i>S. lycopersicum</i>	-	+
19	BGH-2117	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	62	BGH-6901	<i>S. hirsutum</i>	-	-
20	BGH-2118	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	63	BGH-6909	<i>S. pimpinellifolium</i>	-	-
21	BGH-2120	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	64	BGH-6924	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
22	BGH-2121	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	65	BGH-6925	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
23	BGH-2122	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	66	BGH-6926	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
24	BGH-2124	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	67	BGH-6993	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
25	BGH-2125	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	68	BGH-7024	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
26	BGH-2127	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	69	BGH-7192	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
27	BGH-2128	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	70	BGH-7193	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
28	BGH-2131	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	71	BGH-7197	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
29	BGH-2132	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	72	BGH-7213	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
30	BGH-2133	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	73	BGH-7218	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
31	BGH-2134	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	74	BGH-7221	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
32	BGH-2135	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	75	BGH-7222	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
33	BGH-2138	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	76	BGH-7263	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
34	BGH-2141	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	77	BGH-7467	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
35	BGH-2114	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	78	BGH-7466	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
36	BGH-2143	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	79	'Campbell 28'	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
37	BGH-2149	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	80	'Débora'	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
38	BGH-2150	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	81	'Fany'	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
39	BGH-2151	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	82	'Santa Clara'	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
40	BGH-2112	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	83	H24	<i>S. lycopersicum</i>	+	-
41	BGH-2113	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	84	LD7	<i>S. lycopersicum</i>	+	-
42	BGH-2114	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	85	STY4	<i>S. lycopersicum</i>	-	+
43	BGH-2123	<i>S. lycopersicum</i>	-	-					

⁽¹⁾ Homocigoto dominante (resistente) (+), heterocigoto (±) e homocigoto recessivo (suscetível) (-). 'Campbell 28', 'Débora', 'Fany' e 'Santa Clara' representam controles negativos suscetíveis para ambos os genes; as linhagens H24 e LD7, controles positivos para o alelo dominante do gene *Ty-2*; e a linhagem STY4, controle positivo para o alelo dominante do gene *Ty-3*.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação, via PCR, de fragmentos de DNA correspondentes aos genes *Ty-2* e *Ty-3*.⁽¹⁾

Nome	Sequência
<i>Ty-2</i>	
TO302 F	5' TGG CTC ATC CTG AAG CTG ATA GCG C 3'
TO302 R	5' AGT GTA CAT CCT TGC CAT TGA CT 3'
<i>Ty-3</i>	
FLUW25 F	5' CAA GTG TGC ATA TAC TTC ATA TTC ACC 3'
FLUW25 R	5' CCA TAT ATA ACC TCT GTT TCT ATT TCG AC 3'

⁽¹⁾Os oligonucleotídeos para os genes *Ty-2* e *Ty-3* foram descritos por Hanson et al. (2006) e Ji et al. (2007), respectivamente.

STY4. Já a subamostra BGH-6881, apresentou padrão heterozigoto, com amplificação do fragmento de 640 pb e de um segundo fragmento com aproximadamente 580 pb, também amplificado a partir dos controles negativos e dos demais acessos. Portanto, os dois genes analisados (*Ty-2* e *Ty-3*) estão presentes na subamostra BGH-6881.

O gene *Ty-3* foi originalmente identificado nos acessos LA 2779 e LA 1932, ambos da espécie silvestre *S. chilense*. Este gene tem sido utilizado pelo programa de melhoramento genético para begomovírus na Florida, EUA, para conferir resistência ao TYLCV e ao *Tomato mottle virus* (ToMoV) (Ji et al., 2007).

A identificação dos genes *Ty-2* e *Ty-3* em subamostras do BGH-UFV indica a possibilidade de acesso a genótipos portadores de genes de resistência distintos, o que permitiria traçar novas estratégias de melhoramento na cultura do tomateiro, a partir da obtenção de híbridos, linhas ou variedades com um amplo espectro de resistência. Além disso, a introgressão do gene *Ty-3* poderia ser realizada rapidamente, pela facilidade de cruzamento que existe entre os acessos BGH-6878 e BGH-6897, ambos da espécie *S. lycopersicum*.

A facilidade de detecção e a identificação dos genes de resistência com técnicas simples, como a PCR, representam um avanço importante para os programas de melhoramento de tomateiro, no que se refere a viroses transmitidas pela mosca-branca, pois permitem a fácil seleção assistida por marcadores em acessos que se originam dos próprios programas de melhoramento, em qualquer um de seus possíveis genótipos.

Referências

AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G. de; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of

begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.372-377, 2002.

BANCO DE GERMOPLASMA DE HORTALIÇAS. **Banco de germoplasma de hortaliças [home page]**. Disponível em: <http://www.bgh.ufv.br/>. Acesso em: 27 jul. 2010.

CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v.153, p.1985-1989, 2008.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.19-21, 1983.

DUEÑAS, F.; MARTÍNEZ, Y.; ÁLVAREZ, M.; MOYA, C.; PETEIRA, B.; ARIAS, Y.; DIEZ, M. J.; HANSON, P.; SHAGARODSKY, T. Caracterización agromorfológica y evaluación de la resistencia al TYLCV en nuevos genótipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como apoyo al programa de mejoramiento genético de la hortaliza para la enfermedad. **Cultivos Tropicales**, v.29, p.53-60, 2008.

FOOLAD, M.R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. **International Journal of Plant Genomics**, v.1, p.1-52, 2007. <http://dx.doi.org/10.1155/2007/64358>.

GONZÁLEZ-CABEZUELO, J.M.; TOMÁS, D.M.; LORENTE, I.; ABAD, J.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E.; LOZANO, R. Marcadores moleculares ligados a la resistencia a TYLCD en tomate. **Actas de Horticultura**, n.48, p.105-108, 2007.

HANSON, P.; GREEN, S.K.; KUO, G. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. **Tomato Genetics Cooperative Report**, v.56, p.17-18, 2006.

JI, Y.; SCHUSTER, D.J.; SCOTT, J.W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. **Molecular Breeding**, v.20, p.271-284, 2007.

PÉREZ DE CASTRO, A.; BLANCA, J.M.; DÍEZ, M.J.; VIÑALS, F.N. 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**, v.117, p.347-356, 2007.

RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N. de; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v.148, p.281-295, 2003.

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

VIDAVSKY, F.; LEVIATOV, S.; MILO, J.; RABINOWITCH, H.D.; KEDAR, N.; CZOSNEK, H. Response of tolerant breeding lines of tomato (*Lycopersicon esculentum*) originating from three different sources (*L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* and *L. chilense*) to early controlled inoculation by *Tomato yellow leaf curl virus*. **Plant Breeding**, v.117, p.165-169, 1998.