

Eficiência do sistema ‘DR analogs’ em detectar amplicons polimórficos entre acessos de tomateiro contrastantes para resistência a *Stemphylium solani* e *Fusarium* raça 1

Ilka S.L. Cantanhêde¹; Leonardo S. Boiteux^{2,4}; Maria Esther N. Fonseca²; Ailton Reis^{2,4}; José Ricardo Peixoto³

¹FCA - Unesp / Depto. de Produção Vegetal e Melhoramento Genético, Botucatu-SP; ²Embrapa Hortaliças, CP 218, 70359-970, Brasília-DF; ³Universidade de Brasília (UnB)/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV), CP 04508, 70910-900, Brasília-DF. ⁴Bolsista CNPq.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de um conjunto de combinações de ‘primers’ (componentes de um sistema de marcadores moleculares do tipo ‘DR analogs’) em revelar polimorfismos entre acessos de tomateiro que divergem na resposta a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) raça 1 e *Stemphylium solani*. As seqüências dos ‘primers’ do tipo ‘DR analogs’ correspondem a diferentes domínios estruturais conservados em diversos genes de resistência a doenças isolados em plantas, incluindo o próprio tomateiro. Análise via PCR foi conduzida com um total de dez combinações de ‘primers’. Três combinações foram capazes de detectar diretamente amplicons polimórficos entre ‘CNPH 1323’ (resistente a ambos os patógenos) e ‘Ponderosa’ (susceptível aos dois patógenos). Estes marcadores estão sendo caracterizados via análise de seqüências e serão utilizados em estudos visando a existência de ligação destes ‘DR analogs’ com os genes *I-1* (resistência ao FOL raça 1) e *Sm* (resistência a *S. solani*) em populações segregantes para resistência aos dois patógenos.

Palavras-chave: *Fusarium*, *Lycopersicon esculentum*, resistência, marcadores.

ABSTRACT – Efficiency of the ‘DR analog’ marker system in detecting polymorphic amplicons between tomato accessions with contrasting responses to *Stemphylium solani* and *Fusarium* race 1.

The major objective of the present work was to evaluate the efficiency of a set of “Disease Resistance Analog” (DR analog) primers in revealing molecular markers between tomato accessions with divergent response to two important pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and *Stemphylium solani*. The DR analog primers were designed to anneal to distinct structural domains present in several resistance genes isolated in plants, including

tomatoes. PCR assays were conducted with a total of 10 primer combinations. Three combinations were able to detect polymorphic amplicons between the tomato line 'CNPH 1323' (resistant to both pathogens) and 'Ponderosa' (susceptible to both pathogens). These DR analog markers are now being sequence-characterized and they will be evaluated for linkage with the genes *I-1* (*Fusarium* race 1 resistance) and *Sm* (*S. solani* resistance) in populations segregating for resistance to both pathogens.

Keywords: *Fusarium* wilt, gray leaf spot, *Lycopersicon esculentum*, markers.

INTRODUÇÃO

O controle de muitas das principais doenças do tomateiro tem sido alcançado via utilização de cultivares com resistência monogênica e dominantes. Alguns destes genes de resistência do tomateiro estão atualmente mapeados, isolados e clonados (PAN *et al.*, 2000). A maioria deles apresenta aspectos estruturais típicos, incluindo regiões codificadoras de proteínas ricas em leucina e seqüências de aminoácidos com elevada identidade com os domínios NBS (sítios de ligação a nucleotídeos) (PAN *et al.*, 2000). A constatação de seqüências conservadas dentro de genes altamente polimórficos sugeriu, de imediato, que estas regiões poderiam representar sítios de relevância biológica envolvidos na função geral e/ou na regulação da expressão fenotípica destes genes. A informação obtida destas seqüências gênicas foi o fundamento de uma nova classe de marcadores moleculares denominados 'Disease Resistance Analogs' ('DR analogs') (LEISTER *et al.*, 1996). Esta estratégia converte a informação destas estruturas conservadas em 'primers' degenerados capazes de amplificar (via PCR heterólogo) segmentos genômicos contendo seqüências similares mesmo em cultivares e/ou espécies distintas. Esta técnica tem sido útil em gerar marcadores ligados a diferentes "loci" de resistência em tomateiro (PAN *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de um conjunto de 'primers' do tipo 'DR Analogs' em revelar polimorfismos entre acessos de tomateiro que divergem na resistência a dois patógenos: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 1 e *Stemphylium solani*.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas jovens dos acessos 'CNPH 1323' (resistente a *F. oxysporum* raça 1 e *S. solani*) e 'Ponderosa' (susceptível aos dois patógenos) foram coletadas para

extração de DNA. A extração do DNA genômico foi feita de acordo com protocolo de extração CTAB. Foram utilizadas 10 combinações de ‘primers’ DR Analogs’ (PAN *et al.*, 2000). As reações de amplificação foram feitas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700), num volume de 15 µL cada reação e composta por 2 µL do DNA molde, 1,5 µL de tampão (10X) de amplificação (Invitrogen), 0,65 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,1µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 3,2 µL de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dNTPs), 5,2 µL de água milliQ autoclavada e 1µL de cada um dos ‘primers’ da combinação. Amplificação constou de 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 30”, amplificação a 45°C por 1’ e extensão a 72°C por 3’. Os produtos da reação de PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE 1X), corados com brometo de etídio e documentados em um sistema de vídeo Eagleye.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das dez combinações de ‘primers’ avaliadas, três detectaram amplicons polimórficos entre ‘CNPH 1323’ e ‘Ponderosa’. A combinação de “primers” número III, produziu nove bandas monomórficas entre os progenitores, e um único amplicon polimórfico obtido a partir de DNA da linhagem ‘CNPH 1323’ (Figura 1). A combinação de ‘primers’ [F₁ + LM 637] revelou polimorfismos tanto na linhagem ‘Ponderosa’ como em ‘CNPH 1323’. Ainda na Figura 1, pode-se observar o perfil das combinações III e IV, que resultaram em dois amplicons polimórficos. A presença de agrupamento de genes de resistência em regiões cromossômicas específicas é uma característica comum no genoma do tomateiro (PAN *et al.*, 2000). A identificação destes marcadores do tipo “DR analogs” fornece as ferramentas para estudos de mapeamento genético. Estes marcadores estão sendo caracterizados via análise de seqüências e serão utilizados em estudos objetivando verificar a presença de co-segregação com os genes *I-1* (resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 1) e *Sm* (resistência a *S. solani*) em populações segregantes para resistência aos dois patógenos.

LITERATURA CITADA

LEISTER D; BALLVORA A; SALAMINI F; GEBHARDT C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*, v.14, p.421-429.

PAN Q.; LIU Y; BUDAI-HADRIAN O; SELA M; CARMEL-GOREN L; ZAMIR D; FLUHR R. 2000. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. *Genetics*, v.155, p.309-322.

ZHANG LP; KHAN A; NIÑO-LIU D; FOOLAD MR. 2002. A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs *Lycopersicon hirsutum* cross. *Genome*, v.45, p.133-146.

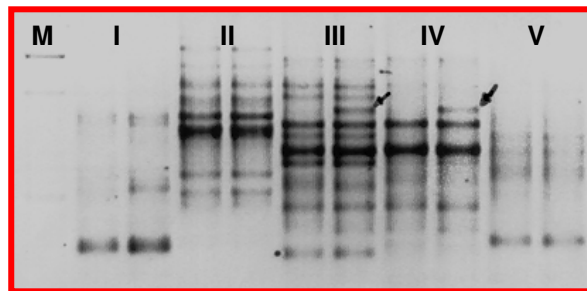


Figura 1. Gel de agarose (1,5%) ilustrando o perfil de amplicons de reações de PCR obtidas com a cultivar de tomate ‘Ponderosa’ (primeira linha) e ‘CNPH 1323’ (segunda linha) com cinco combinações de ‘primers’ do tipo ‘DR analog’ (cada combinação de ‘primers’ está codificadas em algarismos romanos de I até V). Coluna M = padrão de peso molecular (“ladder” 1kb). As setas apontam os amplicons polimórficos entre ‘Ponderosa’ (primeira linha) e ‘CNPH 1323’ (segunda linha) observados com as combinações [“primers” S2 + As3] (combinação III) e [“primers” S2 + Lm637] (combinação IV).