



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

DIAGNOSE RÁPIDA POR PCR PARA O GENE DE RESISTÊNCIA AO PRSV-W EM ABOBRINHA

Haiko Enok Sawazaki¹, Marlon Ricardo Alvez Ortiz², Walter Hissao Banja², Julio Massaharu Marubayashi²; Renan Godoy Perroni³.

¹Instituto Agronômico, APTA, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas-SP. henok@iac.sp.gov.br ²Hortec Tecnologia de Sementes, Bragança Paulista, SP. marlon.ortiz@hortec.com.br ³Bolsista PIBITI/CNPq.

RESUMO – A principal virose em abobrinha é causada pelo *Potyvirus Papaya ringspot virus* estirpe watermelon (PRSV-W). Apesar dos vários genes de resistência reportados para o PRSV-W, marcador de resistência para esta respectiva virose não foi ainda disponibilizado para abobrinha. O objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de marcador molecular para o gene de resistência ao PRSV-W em abobrinha, para facilitar a diferenciação do resistente e suscetível com uma simples reação de PCR. Utilizou-se cultivar suscetível e híbrido resistente sendo realizadas análises em 110 linhagens e híbridos. O marcador específico foi desenvolvido baseado na homologia com genes análogos ou homólogos através da comparação das sequências de marcadores não específicos ou de outras espécies com sequências em abóboras. Dos 19 primers testados para PRSV-W o conjunto 408PRSV/552PRSV formado de um primer de gene dominante e da região correspondente originalmente ao gene recessivo *prsv* diferenciou o híbrido resistente Px7051 da cultivar suscetível La Belle. Verificou-se a ocorrência de polimorfismo consistente em dois fragmentos com cerca de 650pb para suscetível e 750pb para resistente, além de outras bandas não específicas. A análise de 110 plantas de abobrinha previamente testadas dando 85% com o gene de resistência ao ZYMV resultou em 78% com o gene de resistência ao PRSV-W, com 92% de concordância entre os resultados.

Palavras-chave: *Cucurbita pepo*, PRSV-W, marcador molecular, resistência genética.

INTRODUÇÃO

O cultivo de híbridos ou cultivares resistentes representa o melhor método de controle das doenças. Triagem para obtenção de fontes de resistência baseado em sintomas requer tempo, depende do clima e possibilita disseminar o vírus, problemas evitados pelo uso de marcador polimórfico. No Brasil, a principal doença em abobrinha caserta ou italiana (*Cucurbita pepo* L.) é



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

causada pelo Potyvirus denominado *Papaya ringspot virus* - estirpe watermelon (PRSV- W) ou vírus da mancha anelar no mamoeiro.

Em Cucurbitaceas a resistência ao PRSV-W foi reportada controlada pelo gene recessivo *prsv* por BOLANOS-HERRERA (1994) e BROWN et al. (2003), enquanto MALUF et al. (1997) por três genes parcialmente-dominantes ou dois genes com efeitos aditivos, HERRINGTON et al. (1989) por resistência poligênica, TASAKI et al. (1990) por um simples gene dominante e MCPHAIL-MEDINA et al. (2012) sugeriram um gene dominante junto com um supressor dominante epistático. Em melão ANAGNOSTOU et al. (2000) reportaram resistência ao PRSV-W pelos genes *Prv-1*, *Pvv-2*, enquanto em pepino WAI & GRUMET (1995) relataram o gene *Prv-2* de resistência dominante e GRUMET et al. (2000) o gene *prv* de resistência recessiva ao PRSV-W.

Com relação a marcadores em abóboras, não foi reportado ainda marcador de resistência ao PRSV-W. LIHUA & YIFEI (2007) distinguiram sequências tipo RG (SQRGA1 a 6, SQRGA8 a 14), com os acessos no GenBank EF101660 a EF101665, EF101667, EF199755 a EF199760.

Em melão, BROTMAN et al. (2005) reportaram dois marcadores tipo CAPS para o gene dominante *Prv¹*. Um derivado de marcador RGH (tipo NB-LRR) com a sequência AF354504, e outro de RAPD com sequência AY611532, enquanto TEIXEIRA et al. (2006) marcador AFLP (nomeado EK 190) com fragmento de 150pb ligado ao gene de resistência *Prv1*. Em pepino, HAIYING et al. (2006) reportou o marcador RAPD AP7-1800 e a patente CN 104313017 A, de 28/02/2015 reportou um marcador indel do gene de resistência ao PRSV denominado *prsvIndel2-F/prsvvIndel2-R* com amplificação de 176pb e sequência SeqIDNo1 para o suscetível e 170pb para o resistente com sequência SeqIdNo2.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas folhas jovens do híbrido resistente Px7051 da Seminis e da cultivar suscetível La Belle da Hortec Sementes, além de 110 acessos (linhagens e híbridos) de abobrinha para caracterização da presença dos genes *Prsv* ou *prsv* ligados a resistência ao PRSV. A extração de DNA foi feita utilizando CTAB de acordo com a metodologia do laboratório (SAWAZAKI et al., 2013). Foram testados 19 primers desenvolvidos das sequências:



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA **Instituto Agronômico - Campinas, SP**

7 a 9 de Fevereiro de 2017

1. Dos marcadores em melão de BROTMAN et al. (2005) tipo CAPS para o gene dominante *Prv¹*. Das sequências AF354504 de 250pb e AY611532 de 1235pb, foram realizados o BLAST e desenvolvidos inicialmente os primers na região dos SNPs: 12PRSV/410PRSV, 55PRSV/708PRSV, 408PRSV/1155PRSV, 1635PRSV/2194PRSV, 1120PRSV/2194PRSV.
2. Do marcador RAPD de HAIYING et al., (2006) AP7-1800 (AP-7 : 5'- GTG GAT GCG A - 3'), ligado ao gene recessivo, foram realizados testes de PCR.
3. Da patente CN 104313017 A reportando um marcador indel do gene de resistência ao PRSV em pepino (prsvIndel2-F/prsvvIndel2-R) foi realizado o BLAST das sequências SeqID No1 e SeqID No1 que resultou nas sequências de melão LN713265 e LN68192, da qual foram desenvolvidos primers na região correspondente ao indel do pepino: 243PRSV/555PRSV, 96pRSV/248PRSV, 243PRSV/552PRSV.
4. Das regiões genômicas eIF4E e eIF(iso)4E associadas com herança recessiva de resistência a vírus em plantas, pela comparação de pepino com melão de HAVEY et al., (2008), foram desenvolvidos primers próximos da região eIF4E (Genbank EU196160 e EU232173 para pepino) e da região eIF(iso)4E (Genbank EU232172 para melão). Do BLAST da sequência EU232172 foram desenvolvidos os primers 147PRSV/518PRSV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos marcadores testados para PRSV-W o conjunto de primers 408PRSV/552PRSV diferenciou o híbrido resistente Px7051 e a cultivar suscetível La Belle. O marcador 408PRSV/552PRSV foi composto do primer 408PRSV oriundo do gene dominante *Prv¹* em melão e do primer 552PRSV oriundo da região correspondente originalmente ao gene recessivo *prsv* em pepino. Verificou-se a ocorrência de polimorfismo em dois fragmentos com cerca de 650pb para a amostra suscetível e 750pb para a resistente, além de outras bandas não específicas. A Figura 1 apresenta o perfil da reação de PCR com os primers 408PRSV/508PRSV realizada com cinco concentrações de DNA da amostra resistente Px7051 e três para a suscetível La Belle com volume de 15 µl, 20-40ng de DNA, primers para concentração final de 1µM cada, 1mM de MgCl₂, 1X tampão PCR, 0,2mM dNTP e 1,0 a 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Ludwig ou Sinapse) com as condições de uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos seguido por 36



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

ciclos de 94°C por 30s, anelamento a 44°C por 40s e extensão por 45s a 72°C, finalizando com extensão de 5 min a 72°C. Os fragmentos amplificados foram separados em gel 1,5% agarose.

Das 110 amostras de abobrinha cedidas pela Hortec Sementes que haviam sido analisadas previamente para resistência ao *Zucchini yellow mosaic potyvirus* (ZYMV) dando 85% com o gene de resistência, apesar da maioria das amostras analisadas com o gene de resistência ao ZYMV ter também o gene de resistência ao PRSV-W, nem toda amostra com o gene de resistência do ZYMV mostrou também o gene de resistência do PRSV-W (que deu 78% com o gene), sendo de 92% a concordância entre os resultados.

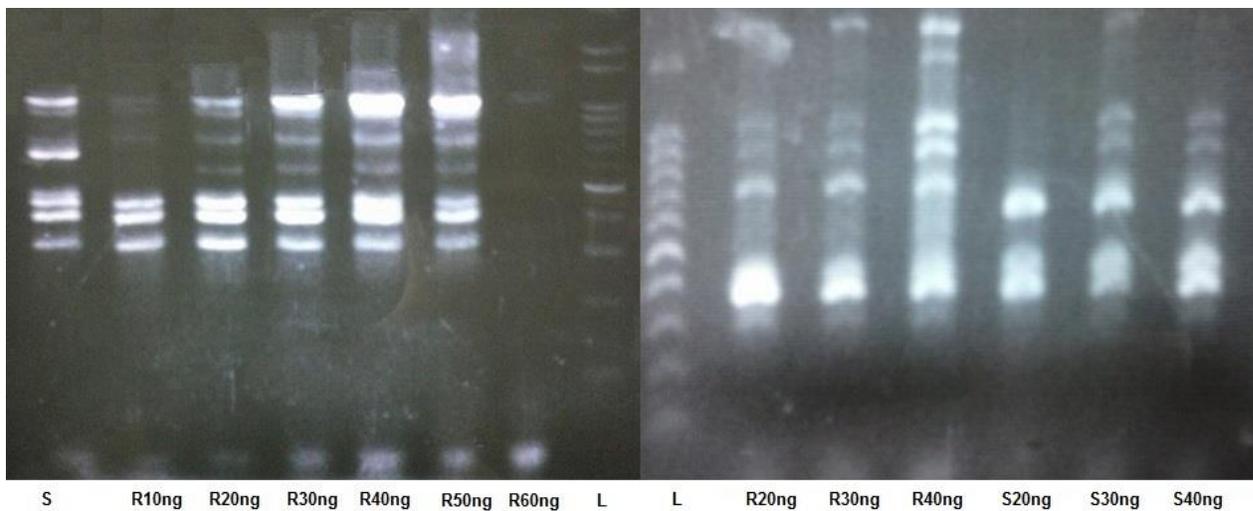


Figura 1. Perfil amplificação das amostras Px705 (R) e LaBelle (S) com os primers 408PRSV/552PRSV com diferentes concentrações de DNA.

A Figura 2 apresenta o perfil de amplificação em amostras de abobrinha com os primers 408PRSV/552PRSV, com doze apresentando o gene de resistência ao ZYMV e oito sem o gene de resistência ao PRSV.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agronômico - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

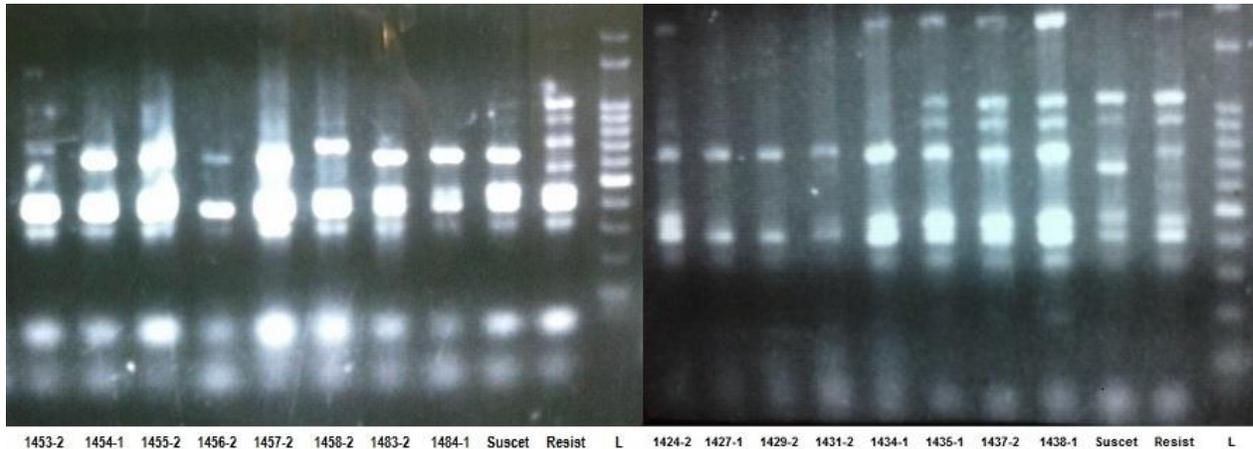


Figura 2. Perfil de amplificação de amostras de abobrinha com os primers 408PRSV/552PRSV

CONCLUSÃO

A ocorrência de polimorfismo em dois fragmentos amplificados com os primers 408PRSV/552PRSV, com cerca de 650pb para suscetível e 750pb para a resistente, comprovou o desenvolvimento de marcadores que possibilitam a diferenciação entre plantas com ou sem o gene de resistência ao PRSV-W, facilitando a distinção entre suscetível e resistente com uma simples reação de PCR, assim como o processo de triagem para obtenção de plantas resistentes ao PRSV-W em abobrinha pelo melhorista.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAGNOSTOU, K.; JAHN, M.; PERL-TREVES, R. Inheritance and linkage analysis of resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Papaya ringspot virus* and powdery mildew in melon. *Euphytica* v.116, p. 265-70, 2000.

BOLANOS-HERRERA AB. Inheritance of virus resistance in *Cucurbita moschata* and *C.maxima*. MS thesis. Dept. of Vegetable Crops, Cornell Univ., Ithaca, NY, 1994.

BROTMAN, Y; KOVALSKI, I.; DOGIMONT, C.; PITRAT, M.; PORTNOY, V.; KATZIR, N.; PERL-TREVES, R. Molecular markers linked to *Papaya ringspot virus* resistance and Fusarium race 2 resistance in melon. *Theor Appl Genet*, v.110, p. 337-345, 2005.

BROWN, R.N.; BOLANOS-HERRERA, A.; MYERS, J.; JAHN, M.M. Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* v.129, p. 253-8, 2003.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

GRUMET, R.; KABELKA, E.; MCQUEEN, S.; WAI, T.; HUMPHREY, R. Characterization of sources of resistance to the watermelon strain of *Papaya ringspot virus* in cucumber: Allelism and co-segregation with other potyvirus resistances. *Theor. Appl. Genet.* v.101, p. 463-72, 2000.

HAIYING, Z.; YUAN, F.Z; YONG-JIAN, W. Identification of Molecular Markers Linked to Important Resistant Genes and Construction of Genetic Map in Cucumber RAPDs, RFLPs, AFLPs. Tese de PhD da Chinese Academy of Agricultural Sciences 2006.

HAVEY, M.J.; MEYER, .D.F.; DELEU, W.; GARCIA-MAS J. Construction of a fosmid library of cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*Cucumis melo*). *Cucurbitaceae* 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th, 2008.

LIHUA, G.; YIFEI, Z. Cloning and Analysis of NBS Class Resistant Gene Analogues in Squash (*Cucurbita Moschata* Duch.). Tese de mestrado. Fujian Agriculture and Forestry University, 2007.

MALUF, W.R.; PEREIRA, J.J.; FIGUEIRA, A.R. Inheritance of resistance to the *Papaya ringspot virus* watermelon strain from two different PI accessions of winter squash *Cucurbita maxima* Duch. *Euphytica* v.94,p. 163-168, 1997.

MCPHAIL-MEDINA, R.; WESSEL-BEAVER, L.; RODRIGUES, J.C.V. Inheritance of resistance to *Papaya ringspot virus* in tropical pumpkin is controlled by at least two genes. In: (Sari, Solmaz and Aras, eds.) Proceedings of the Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae, p. 697-701, 2012.

PATENTE CN 104313017 A Indel marker of PRSV -*Papaya ringspot virus*- resisting gene in cucumber and application thereof de 28/02/2015.

SAWAZAKI, H.E., SÁ, N.L.A.; GONÇALVES, C.R.C.C.B, VEIGA, R.F.A., COLOMBO, C.A. Molecular diagnosis optimization of virus, bacteria and fungi in sugarcane. *International Research H. of Plant Science*, v.49, n.3, p.76-83, 2013.

TASAKI, S.; DUSI, A.N.; LOPES, J.F. Heranca de resistencia ao PRSV-w em um cruzamento interespecifico entre *Cucurbita ecuadorensis* e *C. maxima*. *Horticultura Brasileira*, Brasilia, v.8, n.1, p.70, maio 1990.

TEIXEIRA, A. P. M.; CAMARGO, L. E. A. A molecular marker linked to the PRV1 gene that confers resistance to *Papaya ringspot virus*-type W in melon. *Plant Breeding [online]*, v.125, p.187-190, 2006.

WAI, T.; GRUMET, R. Inheritance of resistance to the watermelon strain of *Papaya ringspot virus* in the cucumber line TMG-1. *HortScience* v.30, p. 338-40, 1995.