



DIAGNÓSTICO MOLECULAR NA INTERAÇÃO TOMATEIRO – GEMNIVÍRUS

Laura Araujo da Silva Amorim¹; Ana Verônica Silva do Nascimento²; Laedson Enéas Cavalcante³.

¹Graduanda em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – CDSA. Universidade Federal de Campina Grande – UFCG; Rua Luiz Grande – s/n, Frei Damião, Sumé-PB (58540-000). Laura.a.5@hotmail.com; ² Doutora em Fitopatologia, Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, CDSA, UFCG; ³Graduando em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, UFCG, CDSA.

RESUMO

O tomateiro é uma das principais hortaliças em termos de importância econômica e alimentar, sendo cultivado em todas as regiões tropicais e subtropicais do Mundo. Dentre os problemas fitossanitários na cultura do tomateiro, destacam-se as doenças causadas por vírus que podem variar amplamente em termos de severidade, incluindo respostas tolerantes que pouco alteram a fisiologia da planta hospedeira, até respostas severas que podem culminar na morte da planta. O projeto teve como objetivo diagnosticar por marcadores moleculares a presença de Geminivírus em tomateiro e identificar possíveis fontes de resistência ao vírus. A metodologia constou de levantamento em áreas produtoras de tomateiro na região do Cariri Paraibano, município de Serra Branca (área 1) e município de Amparo (área 2) com a finalidade de identificar a incidência do vírus na cultura. Amostras foliares de tomateiro foram coletadas para observação, classificação dos sintomas, e avaliação da resistência natural. As amostras foliares também foram utilizadas para extração de DNA, através do método CTAB e Kit Qiagen. Logo após houve a avaliação do DNA viral através de PCR específico, utilizando os marcadores moleculares PAL1v1978 e PAR1c496. Das 46 amostras coletadas na área 1 e 28 amostras na área 2, foram observados sintomas característicos de geminivírus (clareamento das nervuras, manchas amareladas, deformação foliar, rugosidade), equivalendo 13,53% e 8,24%, respectivamente. Na análise molecular o DNA extraído pelo kit Qiagen apresentou-se em boa qualidade e quantidade, sendo possível a visualização de bandas de DNA amplificadas no tamanho, aproximado, de 1,2 Kb, corroborando com o diagnóstico do DNA viral.

Descritores: Marcadores moleculares, Vírus, *Solanum lycopersicum*.

MOLECULAR DIAGNOSIS IN THE INTERACTION TOMATO PLANT - GEMNIVÍRUS

ABSTRACT

The tomato plant is one of the main vegetables in terms of economical and food importance, being cultivated in all the tropical and subtropical regions of the world. Among the problems occur in tomato crop, there are diseases caused by viruses that can vary widely in terms of severity, including answers tolerant than just alter the physiology of host plant, until severe responses that can culminate in the death of the plant. The objective of the project was to diagnose the presence of Geminivirus in tomato plants by molecular markers and identify possible sources of resistance to the virus. The methodology consisted of a survey of tomato producing areas in the region of Cariri Paraibano, municipality of Serra Branca (area 1) and



municipality of Amparo (area 2) in order to identify the incidence of the virus in the crop. Foliaceous tomato plant samples were collected for observation, classification of the symptoms, and evaluation of the natural resistance. The foliar samples were also used for DNA extraction, using the method CTAB and Kit Qiagen. Soon after, the viral DNA was evaluated through specific PCR using the molecular markers PAL1v1978 and PAR1c496. Of the 46 samples collected in area 1 and 28 samples in area 2, characteristic symptoms of geminiviruses (whitening of the veins, yellowish spots, leaf deformation, roughness) were observed, corresponding to 13,53% and 8,24%, respectively. In the molecular analysis the DNA extracted by the kit Qiagen it showed up in good quality and quantity, when there is possible the visualization of directions of DNA amplified in the size, brought near, of 1,2 Kb, corroborating with the diagnosis of the DNA viral.

Keywords: Molecular markers, Virus, *Solanum lycopersicum*.

INTRODUÇÃO

O tomateiro, *Solanum lycopersicum* L., é uma das principais hortaliças cultivadas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esta planta tem uma participação importante na economia e na alimentação, já que o tomate e seus produtos são de grande valor nutricional na dieta humana, os mesmos são uma fonte rica em vitamina C, pró-vitamina A (beta-caroteno) e antioxidantes (licopeno e outros carotenoides) (1). No Brasil, o tomate é fortemente produzido nos estados de Goiás e Minas Gerais. Em relação à região nordeste, o estado da Bahia, é considerado o mais representativo com uma produção de 325.932 toneladas, em uma área de 7.529 hectares (2). Entretanto, com a expansão da área cultivada foram observadas perdas significativas em todas as áreas produtoras, a maioria por problemas fitossanitários (3).

Dentre os problemas fitossanitários na cultura do tomateiro, as doenças causadas por vírus destacam-se, já que as mesmas apresentam respostas fisiológicas diversas, podendo levar até a morte da planta (4). Vários são os vírus que podem infectar a cultura do tomateiro, entretanto, os geminivírus, possuem grande importância econômica, devido às perdas ocasionadas à agricultura (5). A interação geminivirus-tomateiro apresenta-se inicialmente com clareamento das nervuras foliares, além de manchas amareladas e cloróticas no formato de mosaico, rugosidade nas extremidades foliares, e deformação das folhas (6).

A família Geminiviridae é caracterizada por apresentar genoma composto por DNA de fita simples circular, sendo formada por quatro gêneros: Matrevirus, Curtovirus, Topocovirus e Begomovirus, sendo estes classificados com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização de genoma e relacionamento filogenético (7). O gênero



Begomovirus inclui as espécies transmitidas pela “mosca-branca” *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) à espécies dicotiledôneas. Entre os begomovirus de maior importância econômica pode-se citar o Bean Golden mosaic vírus (BGMV), o ACMV e o TYLC (8).

Para se definir uma medida de controle ideal para doenças causadas por vírus no campo, é extremamente necessário um diagnóstico preciso. Esse diagnóstico pode ser realizado através de métodos biológicos, sorológicos e moleculares. Entretanto, os dois primeiros métodos apresentados não apresentam tanta eficiência quanto o último, apesar do mesmo ser significativamente mais caro. O método molecular, com o desenvolvimento de várias técnicas, atingiu eficiência e segurança elevada, principalmente na identificação, classificação, e taxonomia de fitopatogenos (9). Por meio de estudos moleculares a identificação e caracterização de linhagens e genótipos é possível, podendo assim analisar os indivíduos e suas diferenças, que muitas vezes são causadas por alterações de um único par de bases (10)

Portanto, tem-se buscado mais frequentemente a utilização de marcadores moleculares para auxiliar na manipulação de fatores genéticos. O desenvolvimento de marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica vem permitindo a seleção indireta de atributos desejáveis em gerações segregantes precoce, reduzindo assim tempo, fontes e energias necessários para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações e estimar parâmetros usados na seleção indireta. Além de sua importância no melhoramento genético de plantas, os marcadores também são importantes na detecção de variações no genoma, aumentando o poder de análise genética das plantas e diagnósticos precoces de doenças (11, 10)

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo realizar um levantamento na região do Cariri Paraibano quanto à infecção natural de vírus em tomateiro, avaliar a sintomatologia de infecção e identificar por marcadores moleculares via PCR a presença de vírus.

METODOLOGIA

Levantamento de plantas de tomateiro infectadas por vírus:



O experimento foi realizado em áreas produtoras da cultura do tomateiro na região do Cariri Paraibano, nos municípios de Serra Branca (área 1) e Amparo (área 2). Foram coletadas amostras foliares apresentando sintomas de infecção por vírus. As amostras foram fotodocumentadas para comparação de sintomas, embaladas, etiquetadas e levadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Desenvolvimento do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA/UFCG), onde foram armazenadas a -20°C.

Extração total de DNA:

As amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA total utilizando-se os métodos CTAB (12) com algumas modificações e o kit Qiagen. A metodologia consistiu, inicialmente na maceração das folhas, até a formação de um pó bem fino, e incubados em tubos eppendorf de 1,5 mL. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% nos dois casos.

Diagnósticos do DNA viral via PCR específico:

A reação de PCR constituiu na utilização dos oligonucleotídeos PAL1v1978 (5'GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT3') e PAR1c496 (5'AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG3') que amplifica o fragmento de aproximadamente, 1,2 Kb do DNA-A dos geminivírus (begomovírus) (13) em conjunto com o DNA extraído.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de Tampão 10X da enzima Taq DNA Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl (Invitrogen,)), 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,5 µL dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 1,0 µL de cada primer PALv1978/PARc715 (10µM), 0,3 µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL, Invitrogen), água MiliQ e 100ng de DNA. As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador Master Cycler, nas condições de desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 25 ciclos (95°C por 30s; 48°C por 40s e 72°C por 1 min) e extensão final a 72°C durante 3 min. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES



Avaliação dos sintomas

Foram analisadas 340 plantas aleatoriamente em ambas as áreas (1 e 2). Através dessas observações, feitas visualmente em cada uma das plantas avaliadas, foram coletadas 46 plantas na área 1 e 28 plantas na área 2 que apresentaram pelo menos um dos sintomas característico do gemnivirus, o que vale a 13,53% e 8,24% da amostragem, respectivamente.

O sintoma mais evidente nas plantas coletadas na área 1 foi a presença do mosaico amarelado, observado em 44 das 46 plantas coletadas (Figura 3), seguido em menor número de plantas, com rugosidade das extremidades em 20 plantas (Figura 4), e deformação foliar em três plantas. O sintoma de clareamento das nervuras, não apareceu em nenhuma das plantas analisadas no primeiro cultivo.

Da mesma forma ocorreu na área 2, em que o sintoma mosaico amarelo foi observado em todas as 28 plantas coletadas, rugosidade das extremidades apareceu em 21 plantas, deformação foliar em 17 plantas, e clareamento das nervuras em apenas uma planta.

Além das plantas que exibiram sintomas característicos, foram coletadas plantas visualmente sem sintomas para fins de comparação e extração do DNA.

Uma pesquisa similar também apresentou amostras que não exibiam todos os sintomas característicos do begomovirus, tendo através de testes sorológicos o resultado negativo relativo a esse tipo de vírus. Foi apresentada diversas causas para o falso-positivo, como fatores naturais e a utilização de defensivos contra a mosca-branca. Neste mesmo trabalho, foi relatado plantas que não apresentavam sintomas, porém através de testes sorológicos foram diagnosticadas como suscetíveis (14).

Figura 3: Folha com manchas amareladas.

Figura 4: Folha com rugosidade (bordas para cima)



Fonte: Arquivo da pesquisa.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Análise Molecular

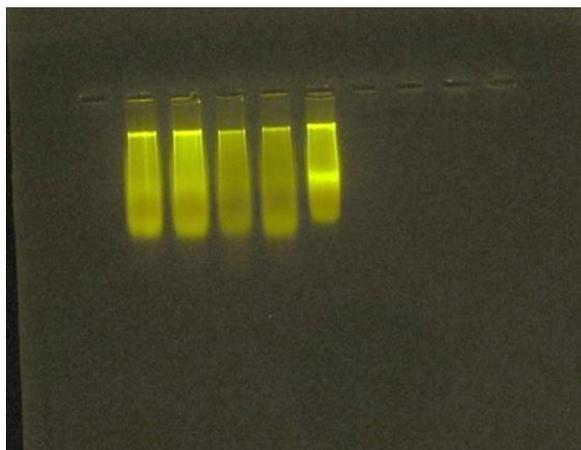
Através do método CTAB foi possível realizar a extração de DNA das amostras coletadas na área 1, e posteriormente sua quantificação (Figura 5). Já a extração de DNA das amostras coletadas na área 2 foi realizada utilizando o kit Qiagen, e posteriormente a quantificação do mesmo (Figura 6).

Nota-se pela Figura 5, que o DNA apresentou um padrão de arraste no gel, que evidencia a degradação do mesmo. Esta degradação pode ser proveniente de diversos fatores, como o tempo de armazenamento da amostra ou possíveis contaminantes. Entretanto, é possível visualizar bandas, evidenciando a extração do mesmo.

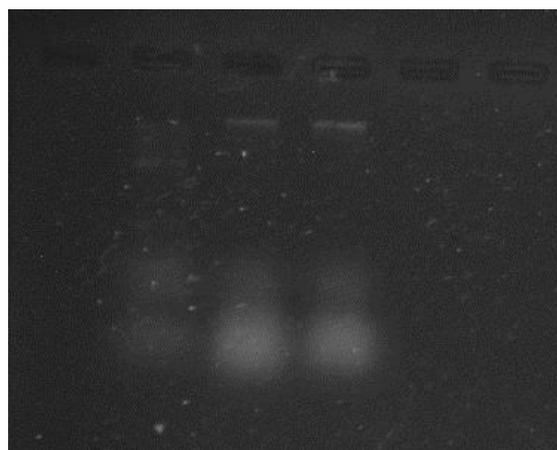
Ao contrário da quantificação com o kit Qiagen, onde é notável através da Figura 6, que a extração do DNA ocorreu de fato, evidenciado pelas bandas presentes no gel.

Figura 5: Quantificação de DNA proveniente de tomateiro em gel de agarose.

Figura 6: Quantificação de DNA proveniente de tomateiro em gel de agarose.



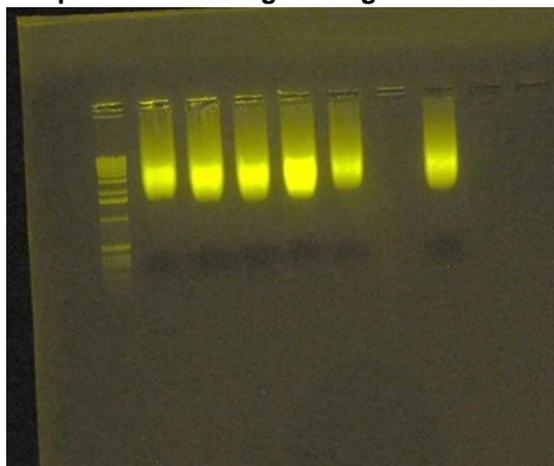
Fonte: Arquivo da pesquisa.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Logo após, foi realizada a reação PCR específico utilizando os marcadores moleculares PAL1v1978 e PAR1c496, ocorrendo a quantificação posteriormente à amplificação (Figura 7).

Figura 7: Amplificação de DNA via PCR quantificado em gel de agarose.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

É possível visualizar na Figura 7 que há um arraste no gel comprometendo o resultado da amplificação, sendo o mesmo proveniente da degradação do DNA anteriormente mencionado neste relatório. Entretanto, ainda é aparente a presença de bandas amplificadas no tamanho, aproximado, de 1,2 Kb, corroborando com o diagnóstico do DNA viral.

CONCLUSÕES



- Nas amostras coletadas foram identificados a incidência do vírus em 46 plantas da área 1 e 28 da área 2.
- Foram observados sintomas variados da severidade do vírus que abrangeu clareamento das nervuras, deformação foliar, manchas amareladas e rugosidade.
- Na análise molecular foi possível a extração das amostras de DNA utilizando os dois métodos (CTAB e Quiagen)
- Foi possível uma amplificação de fragmento de 1,2 Kb utilizando os marcadores moleculares específicos, corroborando com o diagnóstico do DNA viral.

REFERÊNCIAS

1. BOITEUX LS, FONSECA MEN, VIERA JV, PEREIRA-CARVALHO RC. Melhoramento para resistência a doenças virais. In: BORÉM A, FRITSCH-NETO R, editores. Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos. Visconde de Rio Branco, MG: Suprema; 2012. p. 89-119.
2. AGRICULTURAL 2011: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP consultoria e agroinformativo. 2011. 457-464p.
3. TOGNI PHB. Bases Ecológicas para o Manejo de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em Sistemas Orgânicos de Produção de Tomate. (Dissertação). Brasília, DF: Universidade de Brasília; 2009.
4. HULL R. Matthew's Plant Virology. Londres: Academic Press, 2002.
5. BRIDDON RW. Cotton leaf curl disease, a multicomponent Begomovirus Complex. Molecular plant Pathology, 2003; 4(6):427-34.
6. VILLAS-BÓAS GLV, BRANCO MC. Manejo Integrado da Mosca-Branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria (PITI). (Comunicado Técnico). Brasília: Embrapa; 2009.
7. STANLEY J, BISARO DM, BRIDDON RW, BROWN JK, FAUQUET CM, HARRISON BD, et al. Family Geminiviridae. In: FAUQUET CM, MAYO MA, MANILOFF J, DESSELBERGER U, BALL LA, editores. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005. p. 301-326.
8. POTTER JL, NAKHA MK, MEJIA L, MAXWELL DP. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. Plant Disease, 2003; (87): 1205-1212.
9. ZERBINI FM, ZAMBOLIM EM, CARRIJO IV, GILBERTSON RL. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. Phytopathology, 1996; (86): p. S1.
10. BORÉM A, CAIXETA ET. Marcadores moleculares. In: ARRIEL NH, DE CASTRO COSTA MM, TREVISOLI SHU, MAURO AO, editores. Outras aplicações dos marcadores. Viçosa-MG; 2006. p.145-204.
11. MILACH SCK. Seleção assistida por marcadores moleculares em plantas: mito ou realidade? In: XXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia. Pelotas, RS; 2004.



12. DOYLE JJ, DOYLE JL. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem.* 1987; (19): 11–15.
13. Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP. Use of degenerate primers in polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease.* 1993;77:340–347.
14. ARNAUD LSEP, SANTOS CDG, LIMA JAA, FEITOSA FAA. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. *Fitopatologia Brasileira.* 2007; (3): 241- 246.