

JORGE GONZÁLEZ AGUILERA

**VARIABILIDADE MOLECULAR E RESISTÊNCIA A
GEMINIVIRUS EM ACESSOS DE TOMATEIRO DO BGH-UFV**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL**

2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G643v
2007

González Aguilera, Jorge, 1973-
Variabilidade molecular e resistência a geminivirus
em acessos de tomateiro do BGH-UFV / Jorge González
Aguilera. – Viçosa, MG, 2007.
x, 53f. : il. ; 29cm.

Orientador: Derly José Henriques da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tomate - Genética. 2. Tomate - Melhoramento
genético. 3. Marcadores genéticos. 4. Análise multivariada.
5. Germoplasma vegetal - Recursos. 6. Vírus de plantas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.6422

JORGE GONZÁLEZ AGUILERA

**VARIABILIDADE MOLECULAR E RESISTÊNCIA A
GEMINIVIRUS EM ACESSOS DE TOMATEIRO DO BGH-UFV**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 3 de agosto de 2007

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-orientador)

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Co-orientador)

Prof. Alúzio Borém de Oliveira

Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias

Prof. Derly José Henriques da Silva
(Orientador)

Aos meus pais, Gonzalo e Migdalia,

A minha esposa, Janaina,

Aos meus filhos, Ângelo e Fátima,

Aos meus irmãos, Chino, Yanelis, Tomasito,

Miguelito e Eloibis,

Aos meus Sobrinhos, Elbalidia, Rogelito e Yadelis,

Aos meus sogros, Carlos e Marly.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e recursos financeiros para o trabalho de pesquisa.

Ao Centro de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da UFV (BIOAGRO), nomeando aos Laboratórios de Virologia Vegetal e Genética Molecular de Plantas (BIOMOL), imprescindíveis na execução deste trabalho.

Ao Professor Derly José Henriques da Silva pelo incentivo, apoio, orientação e, sobretudo, pela amizade.

Aos Professores Francisco Murilo Zerbini e Everaldo Gonçalves de Barros pela motivação, ensinamentos, disponibilização de espaço físico e recursos materiais para o desenvolvimento da pesquisa.

A meu colega, amigo e irmão Leonardo Dantonini e família, pela sua amizade, orientação e apoio.

Aos colegas Luiz Alberto Pessoni, Miguel Alves Júnior, pelo ensino, orientação e, sobretudo, pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, professores Aluizio Borém de Oliveira e Luiz Antônio dos Santos Dias, pelas críticas e contribuições para a melhoria do trabalho.

A todos os colegas da UFV, em especial a: Luiz, Miguel, Gloria, Evandro, Dani, Alison, Poli, Gabriel, Milton, Ahmed, Tes, Klever, Thiago, Marcia, Valeria, Fernanda, Demerson, Bruno, Cesar, Paulo, Sheila, há todos muito obrigado pela enorme amizade.

Aos meus colegas do Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, em Santiago de Cuba, Cuba, em especial a: Dainelis, David, Chapman Rodolfo, Elizabeth, Yilan, Albys, pelo apoio, motivação e amizade.

Aos professores, pesquisadores, funcionários e estagiários que, mesmo sem terem sido nomeados, contribuíram para minha formação e realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JORGE GONZÁLEZ AGUILERA, filho de Gonzalo González Silva e Migdalia Aguilera Ocampo, nasceu o 5 de Novembro de 1973 em Santiago de Cuba, Cuba.

No ano 1996 recebeu o Título de Engenheiro Agrônomo pelo Instituto Superior de Ciências Agronômicas de Bayamo, província Granma, Cuba. No período de 1996 até 2004, trabalho no Centro Nacional de Eletromagnetismo Aplicado da Universidade de Oriente, Santiago de Cuba; ocupando o cargo de Reserva Científica e depois de Professor e Pesquisador.

Em Agosto de 2005, foi admitido no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de teses no 3 de Agosto de 2007.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3

ARTIGO I- Seleção de acessos de tomateiro resistentes ao begomovirus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). 7

RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	11
<i>CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS</i>	11
<i>GERMOPLASMA AVALIADO</i>	11
<i>ISOLADOS TESTADOS</i>	12
<i>VARIÁVEIS ANALISADAS</i>	12
<i>DETECÇÃO DA INFECÇÃO VIRAL POR MEIO DE PCR E HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR.</i>	12
<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	13
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO.....	19
AGRADECIMENTOS.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

ARTIGO II- Caracterização da diversidade de acessos de *L. esculentum* empregando marcadores moleculares ISSR. ... 29

RESUMO	29
ABSTRACT	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
<i>MATERIAL VEGETAL</i>	33
<i>CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.</i>	34
<i>EXTRAÇÃO DE DNA.</i>	34
<i>QUANTIFICAÇÃO E QUALIDADE DO DNA</i>	35
<i>CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS.</i>	35
<i>RESOLUÇÃO E VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.</i>	36
<i>DISSIMILARIDADE GENÉTICA.</i>	37
<i>ANÁLISES DE AGRUPAMENTOS ENTRE OS ACESSOS.</i>	38

<i>ANALISES DISCRIMINANTE</i>	38
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	48
AGRADECIMENTOS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMO

GONZÁLEZ, Jorge Aguilera, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Variabilidade molecular e resistência a geminivirus em acessos de tomateiro do BGH-UFV.** Orientador: Derly José Henriques da Silva. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

O Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa, mantém cerca de 870 acessos do gênero *Lycopersicon*, muitos deles ainda não caracterizados. Essa cultura é atacada por inúmeras pragas, onde a mosca-branca (*Bemisia tabaci*) é considerada uma das mais importantes. A partir de 1994, ocorreu a introdução de um novo biótipo de *B. tabaci* no Brasil (biótipo B), responsável pela disseminação de novas espécies de begomovírus em tomateiro. Uma dessas novas espécies, o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), causa sintomas severos e com alta precocidade no tomateiro. Dentro deste contexto, nosso trabalho teve como objetivos: (1) avaliar 96 acessos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) quanto a resistência ao gemivirus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e (2) caracterizar a variabilidade genética a partir de dados moleculares. A resistência ao ToYSV foi avaliada através de uma triagem, sendo inoculados os acessos via agroinoculação e via biobalística, empregando o isolado de ToYSV Bi2. Como resultado dessa triagem foi selecionado os acessos que manifestaram o maior padrão de resistência e foram novamente inoculados. Os acessos que se manifestaram como resistentes foram selecionados novamente e inoculados baixo as mesmas condições, sendo plantadas 20 plantas por acessos. Foi avaliada a presença do vírus de modo visual aos 10, 20 e 30 dias após inoculação. Foi confirmada a avaliação visual via PCR e hibridização. Os acessos foram fenotipados tendo como base a porcentagem de plantas infectadas confirmadas por PCR e hibridização, do total de plantas inoculadas. A variabilidade molecular foi caracterizada empregando marcadores moleculares ISSR. Os acessos foram semeados em casa de vegetação e folhas de três plantas por acesso foram coletadas para extração em bulk do DNA. Dez marcadores moleculares ISSR ancorados foram empregados. As bandas analisadas para cada

primer empregado permitiu a construção da matriz de dados binários. A matriz foi empregada no cálculo da dissimilaridade utilizando o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. A matriz foi empregada na realização dos agrupamentos pelo método de otimização de Tocher e hierárquico UPGMA. Dos 96 acessos inoculados via agroinoculação, foram seleccionados 31 acessos classificados como Altamente Resistente (AR), sendo inoculados via biobalística e seleccionados dentre deles 4 acessos. Os 4 acessos seleccionados foram inoculados novamente e como resultado destacou-se o acesso BGH-224 que foi classificado como AR, com apenas 10% de plantas infectadas, e indicado como acesso promissor para obtenção de cultivares com resistência ao ToYSV. Os marcadores ISSR geraram, em conjunto, 53 bandas polimórficas de um total de 144 amplificadas. O *primer* 840 gerou o maior número de bandas polimórficas, com 18 % (13 bandas) das 144 bandas obtidas pelos 10 *primers* empregados. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 250 a 2000 pb. Mediante a avaliação do dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA e o agrupamento pelo método Tocher, foi possível diferenciar os acessos. O acesso BGH-980 foi classificado isoladamente, sendo o mais divergente dos acessos testados. Foram classificados em grupos de 2 acessos os pares de acessos BGH-674 e BGH-991, BGH-616 e BGH-970, ainda que semelhantes não constituem acessos duplicados. Os marcadores ISSR foram úteis na caracterização da variabilidade dos acessos de *Lycopersicon esculentum*, amplificando número relativamente elevado de locos por *primer*, sendo suficiente para discriminar os acessos avaliados.

ABSTRACT

GONZÁLEZ, Jorge Aguilera, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007.
Molecular variability and resistance the geminivirus in accesses of tomato of BGH-UFV. Adviser: Derly José Henriques da Silva. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

The Bank of Germplasm of Vegetables (BGH) of the Federal University of Viçosa, it maintains about 870 accesses of the gender *Lycopersicon*, many of them still no characterized. That culture is attacked by countless curses, where the fly-white (*Bemisia tabaci*) one of the most important is considered. Starting from 1994, it happened the introduction of a new biotype of *B. tabaci* in Brazil (biotype B), responsible for the spread of new begomovirus species in tomato. One of those new species, *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), it causes severe symptoms and with high precocity in the tomato. Inside of this context, our work had as objectives: (1) to evaluate 96 tomato accesses (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as the resistance to the gemivirus *Tomato yellow spot virus* and (2) to characterize the genetic variability starting from molecular data. The resistance to ToYSV was evaluated through a selection being inoculated the accesses through agroinoculação and he saw biobalística, using the isolated of ToYSV Bi2. As a result of that selection it was selected the accesses that manifested the largest resistance pattern and again inoculated. The accesses that showed as resistant they were selected again and inoculated the same conditions low, being planted 20 plants by accesses. It was evaluated her witnesses from the virus in a visual way to the 10, 20 and 30 days after inoculation. The visual evaluation was confirmed through PCR and hybridization. The accesses were fenotipados tends as base the percentage of infected plants confirmed by PCR and hybridization, of the total of inoculated plants. The molecular variability was characterized using molecular markers ISSR. The accesses were sowed in vegetation house and leaves of three plants by access were collected for extraction in bulk of DNA. Ten molecular markers anchored ISSR were used. The bands analyzed for each employed primer allowed the construction of the head office of binary data. The head office was used in I calculate it of the dissimilar using the

complement of the coefficient of similarity of Jaccard. The head office was used in the accomplishment of the groupings by the method of optimization of Tocher and hierarchical UPGMA. Of the 96 accesses inoculated through agroinoculação, 31 accesses were selected classified as highly resistant (AR), being inoculated through biobalística and selected among of them 4 accesses. The 4 selected accesses were inoculated again and as result he stood out the access BGH-224 that was classified as AR with only 10% of infected plants, and suitable as promising access for obtaining of you cultivate with resistance to ToYSV. The markers ISSR generated, together, 53 bands polymorphic of a total of 144 amplified. The primer 840 generated the largest number of bands polimórficas, with 18% (13 bands) of the 144 bands obtained by the 10 used primers. The size of the amplified fragments varied from 250 to 2000 pb. By the evaluation of the dendrogram obtained by the grouping method UPGMA and the grouping for the method Tocher, it was possible to differentiate the accesses. The access BGH-980 was classified separately, being the most divergent of the tested accesses. They were classified in groups of 2 accesses the equal of accesses BGH-674 and BGH-991, BGH-616 and BGH-970, that constitute duplicated accesses. The markers ISSR were useful in the characterization of the variability of the accesses of *Lycopersicon esculentum*, amplifying relatively high number of locos for primer, being enough to discriminate the appraised accesses.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela batata. O tomate pertence à família Solanaceae, abrangendo muitas espécies de cultivo comum (batata, pimentão, berinjela e petúnia), além de plantas daninhas como a beladona e a erva-moura. Essas espécies estão abrigadas em cerca de 90 gêneros (D'Arcy, 1979), os quais são divididos em duas subfamílias, Solanaceae e Cestoideae, com base nos padrões de desenvolvimento do embrião (Taylor, 1986).

A cultura é atacada por inúmeras pragas e doenças, cujo controle químico representa cerca de 30% do custo de produção (Embrapa, 2001). Nos últimos anos, problemas fitossanitários associados a insetos do gênero *Bemisia* (Homoptera:Aleyrodidae) têm se tornado cada vez mais frequente em tomateiros cultivado em todo o mundo (Morales & Jones, 2004; Naranjo & Ellsworth, 2001).

Na década dos anos 90, ocorreu a introdução de um novo biótipo de mosca-branca no Brasil, denominado biótipo B, responsável pela transmissão do vírus de outras culturas para o tomateiro (Melo, 1992). Este novo biótipo é capaz de ter uma maior gama de espécies hospedeiras que o biótipo A, o que é propiciado sua rápida disseminação no Brasil (Ambrozevicius, 2002; Assunção, 2006; Ávila *et al.*, 2004; Bedford *et al.*, 1994; Fancelli *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2001; Lourenção & Nagai, 1994; Maciel-Zambolim *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2003).

Ambrozevicius *et al.* (2002), isolaram em uma planta de tomateiro coletada em São Joaquim de Bicas, MG um novo geminivírus nomeado *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). Esses autores caracterizaram seus principais sintomas, ressaltando a precocidade de seus danos, sua relação filogenética com o begomovírus *Sida mottle virus* (SiMoV) e mais recentemente a possibilidade de pseudo-recombinação com outros begomivírus de tomateiro (Andrade *et al.*, 2006). O emprego de cultivares resistente é o mais promissor método de controle dessas viroses transmitidas por mosca branca no Brasil (Ferraz *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 1999; Lourenção *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2003).

A FAO, no ano de 1996, identificou cerca de 1.300 bancos de genes ou

germoplasma, preservando mais de 5.5 milhões de acessos; deles 78.000 acessos de tomate (Fraleigh, 2006). Os bancos de germoplasma constituem uma forma de conservação *ex situ* dos recursos genéticos, sendo fundamentais para melhorar a produtividade e sustentabilidade agrícola que contribuem assim para desenvolvimento nacional, segurança alimentar, e redução da pobreza. Esses recursos genéticos contem alta variabilidade genética e precisam ser disponibilizados para a comunidade científica, para tanto é necessário caracterizá-los, avaliá-los e catalogá-los.

A caracterização e avaliação de germoplasma visa, em uma primeira instância, gerar subsídios para facilitar as decisões dos curadores de Bancos de Germoplasmas com relação às amostras duplicadas. Gera, ainda, subsídios para programas de melhoramento genético e para o conhecimento da própria riqueza genética da coleção (Silva *et al.*, 2001).

Classicamente, a caracterização de germoplasma tem sido baseada em descritores morfológicos que tenham alta herdabilidade. A avaliação se faz utilizando descritores de interesse agrônômico, os quais normalmente tem baixa herdabilidade. O advento das técnicas moleculares, inicialmente com o uso de isoenzimas, e posteriormente, com as técnicas baseadas na avaliação direta de variações na sequência de DNA, aumenta a possibilidade de acelerar o processo de seleção dos organismos desejados, e conseqüentemente, reduzir o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento com o qual se aumenta consideravelmente a eficácia do programa (Ferreira & Grattapaglia, 1998)

O genoma do tomateiro está entre os mais investigados dentre os vegetais, tendo obtido um amplo número de marcadores moleculares (Kochieva *et al.*, 2002a; Kochieva *et al.*, 2002b; Tikunov *et al.*, 2003). Entretanto, segundo Tikunov *et al.*(2003), a procura por novos marcadores com um elevado polimorfismo molecular é essencial.

Os ISSRs (“*inter-simple sequence repeats*”), também denominados ISA (Inter-SSR amplification), amplificam regiões entre locos de SSR (pequenas seqüências de 2-5 pares de bases) e não requerem seqüências conhecidas, evidenciando elevado polimorfismo no material caracterizado, sendo muito úteis em estudos de diversidade genética, filogenia, genômica e biologia evolutiva (Reddy *et al.*, 2002).

Os ISSRs estão sendo utilizados por vários autores na caracterização molecular de numerosas espécies vegetais (Marotti *et al.*, 2007; Masumbuko & Bryngelsson,

2006; Saini *et al.*, 2004). Quando comparados com os marcadores SSR (Goulão & Oliveira, 2001), RFLP (Nagaoka & Ogihara, 1997) e RAPD (Souframanien & Gopalakrishna, 2004), os marcadores ISSR foram considerados mais eficientes ao reproduzir um número maior de bandas polimórficas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar 96 acessos da espécie *Lycopersicon esculentum* Mill, quanto a tolerância ao geminivírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e caracterizar a variabilidade genética a partir de dados moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27:372-377. 2002.

Andrade, E.C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. *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. 2006.

Assunção, I., Listik, A., Barros, M., Amorim, E., Silva, S., Izael, O., Ramalho-Neto, C.E., Lima, G.S.A. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na Região Nordeste. *Planta Daninha* 24:239-244. 2006.

Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K., Costa, H., Boiteux, L.S., Neves, L.O., Prates, R.S. & Bertini, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira* 22:655-658. 2004.

Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. & Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology* 125:311-325. 1994.

Brown, J.K., Frohlich, D.R. & Rosell, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* 40:511-534. 1995.

D'Arcy, W.G. Solanaceae studies. In: (Ed.). *The Biology and taxonomy of the*

Solanaceae. London: Academic Press, 1979. pp. 3-47.

EMBRAPA. Mosca-branca e as geminiviruses do tomateiro. *Disponível em:* <http://www.cnpq.embrapa.br/public/folders/foldmb.html>. 2001

Fancelli, M., Vendramim, J., Lourenção, A.L. & Dias, C. Atractividade e preferência para ovoposição de *Bermisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotipo B em genótipos de tomateiro. *Neotropical Entomology* 32:319-328. 2003.

Ferraz, E., Resende, L.V., Lima, G.S., Silva, M.C., França, J.G. & Silva, D.J. Redenção: nova cultivar de tomate para a indústria resistente a geminivírus e tospovírus. *Horticultura Brasileira*. 21:578-580. 2003.

Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (3a). Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN. 220p. 1998.

Ferreira, P.T.O., Bezerra, I.C., Villas-Boas, G.L., Ribeiro, S.G. & Giordano, L.B. Avaliação de fontes de resistência a isolado de geminivírus com genoma bipartido transmitido por *Bemisia argentifolli* em *Lycopersicon spp.* *Fitopatologia Brasileira* 24:131-135. 1999.

Fraleigh, B. Global overview of crop genetic resources. In: RUANE, J. & SONNINO, A. (Ed.). *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. Roma, Italia: Divisão de Informação da FAO, v.10, 2006. pp. 21-31.

Goulão, L. & Oliveira, C. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122:81-89. 2001.

Kochieva, E.Z., Ryzhova, N.N., Khrapalova, I.A. & Pukhal'skiä-, V.A. Using RAPD for estimating genetic polymorphism in and phylogenetic relationships among species of the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. *Genetika* 38:2002a.

Kochieva, E.Z., Ryzhova, N.N., Khrapalova, I.A. & Pukhalskyi, V.A. Genetic diversity and phylogenetic relationships in genus *Lycopersicon* (Torn) Mill. as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Russian Journal of Genetics* 38:958-966. 2002b.

Lima, M.F., Bezerra, I.C., Ribeiro, S.G. & Ávila, A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale do São

Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 26:81-85. 2001.

Lourenção, A.L., Melo, A.M., Siqueira, W.L., Colariccio, A. & Melo, P.C. Avaliação da resistência de acessos de tomateiro a tospovírus e a geminivírus. *Horticultura Brasileira* 22:193-196. 2004.

Lourenção, A.L. & Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia* 53:53-59. 1994.

Maciel-Zambolim, E., Costa, H., Capucho, A.S., De Ávila, A.C., Inque-Nagata, A.K. & Kitajima, E.W. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira* 29:325-327. 2004 29:325-327. 2004.

Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P. & Dinelli, G. Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:175–188. 2007.

Masumbuko, L. & Bryngelsson, T. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of diploid coffee species and cultivated *Coffea arabica* L. from Tanzania. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:357-366. 2006.

Matos, E., Siqueira, W., Lourenção, A., Melo, A., Sawazaki, H., Sousa-Dias, J. & Colariccio, A. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 28:159-165. 2003.

Melo, P. C. T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil, Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin. 1992.

Morales, F.J. & Jones, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100:57-65. 2004.

Nagaoka, T. & Ogihara, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 94:597-602. 1997.

Naranjo, S.E. & Ellsworth, P.C. Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Protection* 20:707. 2001.

Reddy, M., Sarla, N. & Siddiq, E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17. 2002.

Saini, N., Jain, N., Jain, S. & Jain, R. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. *Euphytica* 140:133-146. 2004.

Santos, C.D., Àvila, A.C. & Resende, R.O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira* 28:664-673. 2003.

Silva, D.J., Moura, M.C. & Casali, V.W. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta. *Horticultura Brasileira* 19:108-114. 2001.

Souframanien, J. and T. Gopalakrishna (2004). "A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers." *Theor Appl Genet* **8**(109): 1687–1693.

Taylor, I.B. Biosystematic of the tomato. In: *The tomato crop: a scientific basis for improvement*. ATHERTON, J.G. & RUDICH, J. (Ed.).London, pp. 1-34, 1986.

Tikunov, Y.M., Khrustaleva, L.I. & Karlov, G. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica* 131:71-80. 2003.

ARTIGO I - Seleção de acessos de tomateiro resistentes ao begomovirus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV).

RESUMO

Foram avaliados em casa-de-vegetação 96 acessos da espécie *Lycopersicon esculentum* Mill. do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV), para avaliar possíveis fontes de resistência ao begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). Foi empregado o isolado Bi2 do ToYSV. Os acessos foram inoculados no primeiro experimento via agroinoculação. Dentre estes foram selecionados os acessos que não apresentaram sintomas e presença do vírus. Estes acessos foram avaliados via biobalística em dois experimentos para confirmar a resistência ao isolado testado. Avaliações visuais e confirmação por meio de PCRs e hibridização foram realizadas aos 10, 20 e 30 dias após inoculação (dpi). Baseando-se na porcentagem de plantas infectadas aos 30 dpi foi realizada fenotipagem dos acessos. No primeiro experimento foram selecionados 31 acessos classificados como Altamente Resistentes (AR). Com a fenotipagem dos acessos, no segundo experimento, foi possível selecionar os acessos BGH-224, BGH-674 e BGH-773, com apenas 20% das plantas infetadas portanto classificados como Resistentes (R). O acesso BGH-184, foi classificado como Moderadamente Resistentes (MR), com 40% das plantas infectadas, sendo também incluído na seleção. Os quatro acessos foram re-inoculados num terceiro experimento, onde foram observadas diferenças entre os quatro acessos selecionados, destacando-se o acesso BGH-224 que foi classificado como AR com apenas 10% de plantas infectadas, e por isto é indicado como acesso promissor para obtenção de cultivares com resistência ao ToYSV.

Palavras-chave adicionais: Geminivírus, variabilidade genética, germoplasma, *Lycopersicon esculentum*, fonte de resistência.

ABSTRACT

Selection of accesses of resistant tomato to begomovirus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). González, J.A., Alves-Júnior, M., Silva, D.J.H. & Zerbini, F. M.

They were appraised in vegetation house 96 accesses of the species *Lycopersicon esculentum* Mill. of the Bank of Germplasm of Vegetables of the Federal University of Viçosa (BGH-UFV), to evaluate possible resistance sources to the begomovirus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). The accesses were inoculated with isolated Bi2 in the first experiment through agroinoculação. Among these they were selected the accesses that didn't present symptoms and presence of the virus. These accesses were appraised saw biobalística in two experiments to confirm the resistance to the isolated tested. Visual evaluations and confirmation through PCRs and hybridization were accomplished to the 10, 20 and 30 days after inoculation (dpi). Basing on the percentage of plants infected to the 30 dpi fenotipagem of the accesses was accomplished. In the first experiment 31 accesses were selected classified as highly resistant (AR). With the phenotypic of the accesses, in the second experiment, it was possible to select the accesses BGH-224, BGH-674 and BGH-773, with only 20% of the infected plants therefore classified as resistant (R). lit BGH-184, was classified as moderately resistant (MR), with 40% of the infected plants, being also included in the selection. They were observed, in the third experiment, differences among the four selected accesses, standing out the access BGH-224 that was classified as AR with only 10% of infected plants, and for that is suitable as promising access for obtaining of you cultivate with resistance to ToYSV.

Keywords: Geminivirus, genetic variability, germplasm, *Lycopersicon esculentum*, resistance source.

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro é atacada por inúmeras pragas e doenças, cujo controle químico representa cerca de 30% do custo de produção (Embrapa, 2001). Nos últimos anos, problemas fitossanitários associados a insetos do gênero *Bemisia* (Homoptera:Aleyrodidae) têm se tornado cada vez mais frequente em tomateiros cultivado em todo o mundo (Morales & Jones, 2004; Naranjo & Ellsworth, 2001). Em decorrência do aumento populacional de *Bemisia* sp. (vulgarmente denominado “mosca-branca”), tem ocorrido aumento na incidência de viroses, ocasionada pela transmissão natural de geminivírus por esses insetos, tornando-se um dos principais problemas na cultura do tomateiro no Brasil (Villas Bôas *et al.*, 2002; Bedford *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2001; Lourenção & Nagai, 1994; Santos *et al.*, 2004).

Os geminivírus ganharam importância econômica em tomateiro no Brasil, a partir da introdução de um novo biótipo de mosca-branca, biótipo B (Melo, 1992). Quando comparado com o biótipo A, este novo biótipo é capaz de ter uma maior gama de espécies hospedeiras, o que é propiciado sua rápida disseminação no Brasil (Villas Bôas *et al.*, 2002; Bedford *et al.*, 1994; Lourenção & Nagai, 1994; Santos *et al.*, 2003; 2004). Santos *et al.* (2003) demonstraram que além da característica anteriormente mencionada, outro aspecto que torna o controle da mosca branca importante é o fato da interação vírus-vetor ser estabelecida desde a fase inicial do desenvolvimento do inseto, o que pode ser considerado relevante para os estudos epidemiológicos dos begomovírus associados ao biótipo B de *B. tabaci* no Brasil.

Desde o início da década de 90, oito novas espécies de geminivírus foram descritas infectando o tomateiro no Brasil: *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), *Tomato crinkle virus* (ToCrV), *Tomato infectious yellows virus* (TIYV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), algumas delas presentes em várias regiões do

país e outras restritas a determinadas regiões (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 1997; 2000; Fernandes *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2003).

Mediante estudos de distribuição e diversidade genética de begomovírus no Sudeste do país foram caracterizadas três novas espécies: o ToRMV, presente no Triângulo Mineiro (Fernandes *et al.*, 2006) e duas espécies descritas na Zona Metalúrgica, o ToCMoV e o ToYSV (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Calegario *et al.*, 2004). O ToYSV, além de infectar o tomateiro e induzir sintomas severos, infecta espécies de plantas invasoras como *Macroptilium* e *Sida* (Calegario, 2004). Esta nova espécie vem sendo caracterizada em termos moleculares e biológicos (Andrade *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2004).

O uso de cultivares resistentes é o mais promissor método de controle dessas viroses, comparado ao controle de plantas daninhas, utilização de mudas livres de vírus, controle da mosca branca, período livre de tomateiro no campo e utilização de plantas transgênicas (Freitas-Astúa *et al.*, 2002; Zerbini, 2006). Numerosos trabalhos foram desenvolvidos no Brasil (Ferraz *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 1999; Giordano *et al.*, 2005; Lourenção *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2003) e no mundo (Lapidot *et al.*, 2001; Picó *et al.*, 1999; Piven *et al.*, 1995; Tripathi & Varma, 2003; Zakay *et al.*, 1991) com o objetivo de obter fontes de resistência a geminivírus (principalmente ao TYLCV, que até hoje não foi detectado no Brasil) em espécies do gênero *Lycopersicon*.

Os bancos de germoplasma constituem forma de conservação de recursos genéticos, e neles podem ser encontradas possíveis fontes de resistência a pragas e doenças, que podem ser incorporadas a cultivares comerciais através de programas de melhoramento (Silva *et al.*, 2001).

Acessos de *Lycopersicon* conservados no Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (BGH-UFV) têm sido utilizados de forma sistemática na busca de fontes de resistência a pragas e doenças (Silva *et al.*, 2001), tendo sido identificados até o momento quatro fontes de resistência para *Tuta absoluta* (Suinaga *et al.*, 2003) e uma para *Peper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Juhász *et al.*, 2006). O presente trabalho teve como objetivo avaliar possíveis fontes de resistência ao begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) dentre 96 acessos da espécie *Lycopersicon esculentum* Mill. do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições Experimentais

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitopatologia da UFV, em casa-de-vegetação, em delineamento inteiramente casualizado. Os experimentos foram realizados durante o período de Março/2006 e Abril/2007. As plantas foram cultivadas em vasos de um litro de capacidade contendo substrato composto de mistura de terra e esterco bovino na proporção 3:1, respectivamente, e previamente esterilizado. Cada parcela foi constituída por uma planta em cada vaso.

Germoplasma avaliado

Foram avaliados 96 acessos da espécie *Lycopersicon esculentum* Mill. pertencentes à coleção do BGH-UFV, e duas testemunhas suscetíveis (híbrido 'Débora' e cultivar 'Santa Clara').

No primeiro experimento foi realizada uma triagem inicial utilizando agroinoculação (Grimsley *et al.*, 1986), empregando-se a estirpe LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, com o objetivo de descartar o maior número possível de acessos suscetíveis ao ToYSV. A agroinoculação foi realizada quando as plantas se encontravam no estágio de quatro pares de folhas completamente expandidas. Dois dias antes da inoculação do vírus, as plantas foram incubadas em câmara de crescimento a 22°C e mantidas nessas condições até dois dias após inoculação, sendo transferidas para casa-de-vegetação para as futuras avaliações. Plantas individuais foram agroinoculadas com culturas de *Agrobacterium* transformadas com os clones correspondente ao DNA-A e -B do ToYSV, resuspendidos previamente em 25 ml de tampão de inoculação (10mM MgCl₂, 10mM de MES, 200µm de acetoseringona). A concentração final da suspensão bacteriana foi ajustada para OD₆₀₀ de 1,2. A agroinoculação foi realizada na região da gema apical de cada planta, previamente cortada. Com auxílio de uma seringa, foram inoculadas aproximadamente 50µl da suspensão bacteriana em cada planta. Três plantas por acesso foram inoculadas, constituindo as parcelas, e mantidas em casa-de-vegetação para observação de sintomas até 30 dias após inoculação (dpi).

De acordo com os resultados do primeiro experimento, foram selecionados 31

acessos e conduzido um segundo experimento, com cinco repetições de cada um dos acessos previamente selecionados, sendo adotados os mesmos procedimentos de instalação e delineamento do experimento anterior. As plantas de tomateiro no estádio de dois pares de folhas verdadeiras foram inoculadas via biobalística (Aragão *et al.*, 1996), utilizando 2µg de cada componente genômico. As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação para observação de sintomas até 30dpi.

A partir do resultado do segundo experimento foram selecionados acessos fenotipados como resistentes (R). Os acessos foram plantados sob as mesmas condições descritas nos experimentos anteriores com 20 repetições por acesso e inoculados via biobalística conforme descrito para o segundo experimento. As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação para observação de sintomas até 30dpi.

Isolados testados

Foi utilizado o isolado Bi2 do ToYSV isolado por Ambrozevicius *et al.* (2002) em uma planta de tomateiro coletada no município de São Joaquim de Bicas, na Zona Metalúrgica de MG. Para a inoculação via biobalística (Aragão *et al.*, 1996) foram utilizados os clones pToYSV-A1.2 e pToYSV-B1.2, descritos por Andrade *et al.* (2006). Para a agroinoculação (Grimsley *et al.*, 1986), foram utilizados os clones correspondentes a 1,2 cópias do DNA-A e DNA-B do ToYSV, inseridos no vetor pCAMBIA1301 (Andrade *et al.*, 2006).

Variáveis analisadas

A presença ou ausência do vírus foi avaliada de forma visual nos três experimentos, classificando-se a planta como suscetível sempre que observado pelo menos um dos sintomas característicos do ToYSV, como mosaico severo, epinastia, manchas cloróticas e encarquilhamento foliar (Andrade *et al.*, 2006). Utilizou-se escala de notas de 0 e 1 adaptada de Lourenção *et al.* (2004), onde 0- ausência de sintoma e 1- presença de sintomas característicos do vírus. As avaliações foram realizadas nos intervalos de 10, 20 e 30 dpi, quantificando-se o número de plantas suscetíveis em relação ao total de plantas inoculadas.

Deteção da infecção viral por meio de PCR e hibridização molecular

A confirmação da infecção viral nos dois primeiros experimentos foi realizada por meio de reações de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos universais PAL1v1976 e PAR1c496 para o gênero *begomovirus* (Rojas *et al.*, 1993). O DNA total das plantas inoculadas foi extraído de acordo com Dellaporta *et al.* (1983). A

amplificação foi realizada em termociclador programado para etapa inicial de 2 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 55°C e 1,5min a 72°C, com extensão final de 10min. a 72°C. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 0,7% (p/v).

Segundo a metodologia descrita por Gilberson *et al.* (1991), foi realizada hibridização molecular para confirmar a infectividade do terceiro experimento. As membranas foram submetidas à hibridização com sonda específica para detecção do ToYSV, correspondente a um fragmento de DNA-A liberado a partir do clone pToYSV-A 1.2 por meio da digestão com a enzima *Pst* I. A sonda foi marcada radiotivamente com α -[³²P]-dCTP utilizando-se o kit Prime-it II (Stratagene), conforme instruções do fabricante. A hibridização e lavagens foram realizadas de acordo com técnicas padrão (Ausubel *et al.*, 1991), adotando-se condições de alta especificidade (hibridização a 42°C e lavagem a 65°C).

A fenotipagem dos acessos foi realizada segundo proposto por Tripathi & Varma (2003), com modificações. Baseando-se na porcentagem de plantas infectadas (número de plantas positivas no teste de PCR ou hibridização molecular em relação ao total de plantas testadas) a fenotipagem foi dividida em cinco categorias: Altamente Resistentes (AR) (0-10%), Resistentes (R) (11-20%), Moderadamente Resistentes (MR) (21-40%), Suscetíveis (S) (41-60%) e Altamente Suscetíveis (AS) (61-100%).

Análise estatística

As notas atribuídas ao número de plantas sintomáticas por acesso, foram transformadas em $(X+0,5)^{1/2}$, e submetidas à análises de variância pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey ($P<0,05$). Foi empregado o aplicativo estatístico GENES nas análises estatísticas (Cruz, 2006).

RESULTADOS

Noventa e seis acessos de tomateiro do BGH-UFV foram agroinoculados com o ToYSV no primeiro experimento. Conforme os resultados obtidos (Tabela 1), cinquenta e sete acessos foram classificados como Altamente Suscetíveis (AS) ao ToYSV, pois 66,67 e 100% das plantas avaliadas, ou seja, duas e três plantas por acesso foram infectadas pelo vírus, respectivamente. Oito acessos foram classificados como Moderadamente Resistentes (MR), com apenas uma planta

infectada por acesso dentre as três analisadas. Foram classificados como Altamente Resistentes (AR), 31 acessos, pois 100% das plantas avaliadas não possuíam sintomas característicos da infecção pelo ToYSV. Esses acessos foram selecionados como possíveis fontes de resistência e avaliadas, com maior rigor, no segundo experimento. Apesar da eficiência do método de agroinoculação, não foi observada sintomatologia típica do vírus, manifestando-se apenas mosaico leve nos acessos avaliados.

Tabela 1. Resposta de 96 acessos de *Lycopersicon esculentum* a infecção com ToYSV via agroinoculação, confirmada por PCR aos 30 dias após inoculação

Critério de Avaliação ^a	Número de acessos	Porcentagem ^b (%)	Reação Genótipo ^c
0	31	32,29	AR
1	8	8,33	MR
2	47	48,96	AS
3	10	10,42	AS
Total	96	100	

^a número de plantas infectadas baseado no PCR,

^b número de acessos do total de acessos testados,

^cAltamente resistente (AR); Moderadamente resistente (MR) e Altamente suscetível (AS).

No segundo experimento (Tabela 2) foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os acessos, e assim foi possível discriminá-los, desde Altamente Suscetíveis (AS) a Resistentes (R). Os acessos foram fenotipados com base na porcentagem de plantas infectadas na última avaliação. Assim, foram classificados como AS (58%), S (16%), MR (16%) e R (10%) do total de acessos.

Neste experimento, os acessos BGH-224, BGH-674 e BGH-773 foram classificados como R e foram selecionados como possíveis fontes de resistência. No acesso BGH-184 foi observado atraso no aparecimento dos sintomas, verificados apenas na última avaliação (30 dpi). Esse acesso foi classificado como Moderadamente Resistente (MR), com duas plantas infectadas das cinco plantas inoculadas, o que justificou a sua seleção como uma possível fonte de resistência.

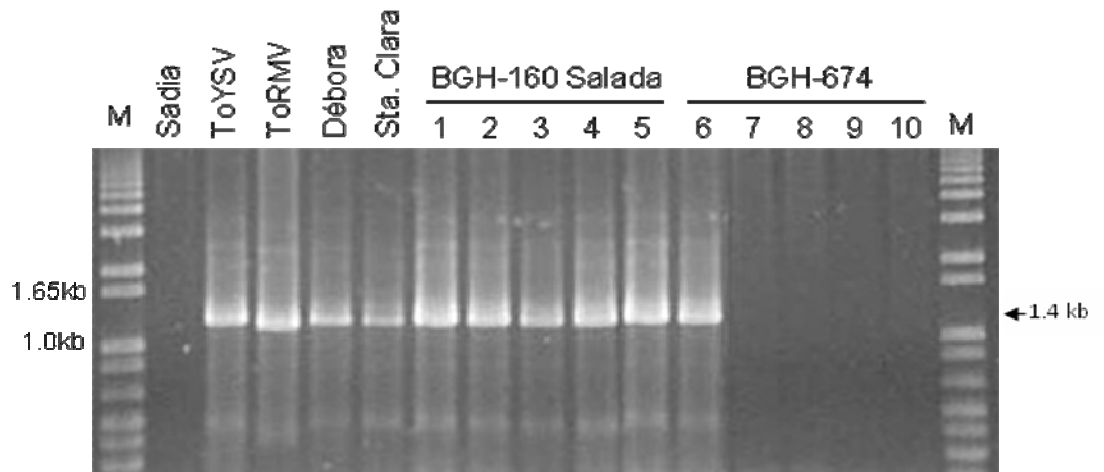


Figura 1. Detecção viral via PCR com oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus*. Sadia: controle negativo (planta sadia); ToYSV, ToRMV: amplificação a partir de clones correspondentes ao genoma completo dos dois vírus. Plantas do híbrido Débora e de ‘Santa Clara’ inoculadas com o ToYSV; BGH-160 Salada, 1 a 5: plantas desse acesso inoculadas com o ToYSV; BGH-674: 6 a 10 plantas desse acesso inoculadas com o ToYSV. M, marcador “1kb plus DNA ladder”. A banda localizada a aprox. 1,4 Kb indica o fragmento do genoma viral amplificado.

Na Figura 1 pode-se observar parte dos resultados da última avaliação da infecção viral via PCR utilizando um acesso suscetível (BGH-160 Salada) e outro resistente (BGH-674), ilustrando a confirmação dos sintomas visuais por PCR no segundo experimento (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da avaliação do PCR em 31 acessos do BGH da UFV, inoculados com ToYSV via biobalística

Acessos	Dias após inoculação (dpi) ¹			Reação do ⁴ Genótipo
	10	20	30	
BGH - 83	5/5 ² a	2/5 d	3/5 c	S
BGH - 121	3/5 c	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 160S	2/5 d	4/5 b	5/5 a	AS
BGH - 161	3/5 c	1/5 e	2/5 d	MR
BGH - 168	0/5 f	3/5 c	3/5 c	S
BGH - 184	0/5 f	0/5 f	2/5 d	MR
BGH - 224	1/5 e	0/5 f	1/5 e	R
BGH - 225	0/5 f	1/5 e	3/5 c	S
BGH - 320	1/5 e	2/5 d	2/5 d	MR
BGH - 327	1/5 e	1/5 e	3/5 c	S
BGH - 349	5/5 a	5/5 a	5/5 a	AS
BGH - 351	4/5 b	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 378	5/5 a	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 468	0/5 f	2/5 d	2/5 d	MR
BGH - 674	1/5 e	1/5 e	1/5 e	R
BGH - 773	0/5 f	0/5 f	1/5 e	R
BGH - 970	4/5 b	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 980	4/5 b	2/5 d	4/5 b	AS
BGH - 985	4/5 b	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 987	4/5 b	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 1211	5/5 a	5/5 a	5/5 a	AS
BGH - 1214	4/5 b	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 1254	4/5 b	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 1497	4/5 b	4/5 b	4/5 b	AS
BGH - 1498	5/5 a	5/5 a	5/5 a	AS
BGH - 1532	3/5 c	3/5 c	2/5 d	MR
BGH - 1708	5/5 a	5/5 a	5/5 a	AS
BGH - 1990	5/5 a	5/5 a	5/5 a	AS
BGH - 2119	5/5 a	5/5 a	5/5 a	AS
BGH - 2202	5/5 a	4/5 b	3/5 c	S
BGH - 4209	5/5 a	5/5 a	5/5 a	AS
Débora ³	5/5 a	5/5 a	5/5 a	AS
Santa Clara ³	4/5 b	4/5 b	4/5 b	AS
CV (%)	10,85	12,46	13,32	

¹ Mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

² Plantas com sintomas/plantas inoculadas.

³ Testemunhas suscetíveis.

⁴ R: resistente; MR: moderadamente resistente; S: susceptível; AS: altamente susceptível.

No terceiro experimento (Tabela 3), feito a partir da seleção de acessos obtida no segundo experimento, foram constatadas diferenças estatísticas entre os acessos nas três avaliações realizadas. Segundo o método de classificação descrito por Tripathi & Varma (2003), com base na porcentagem de plantas infectadas dentre os acessos avaliados, foram classificados como MR os acessos BGH-184, BGH-674 e BGH-773 e como AR o acesso BGH-224.

Tabela 3. Resultado do teste de hibridização molecular em quatro acessos da espécie *Lycopersicon esculentum* inoculados com o geminivírus ToYSV via biobalística

Acessos	Dias após inoculação (d.p.i.) ¹			Reação ³ Genótipo
	10	20	30	
BGH 184	10/20 ² b	11/20 a	8/20 a	MR
BGH 224	10/20 b	6/20 c	2/20 c	AR
BGH 674	11/20 a	10/20 b	5/20 b	MR
BGH 773	6/20 c	10/20 b	8/20 a	MR
CV (%)	12,80	12,64	11,69	

¹ Mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05),

²Plantas infectadas/plantas inoculadas,

³AR: altamente resistente e MR: moderadamente resistente.

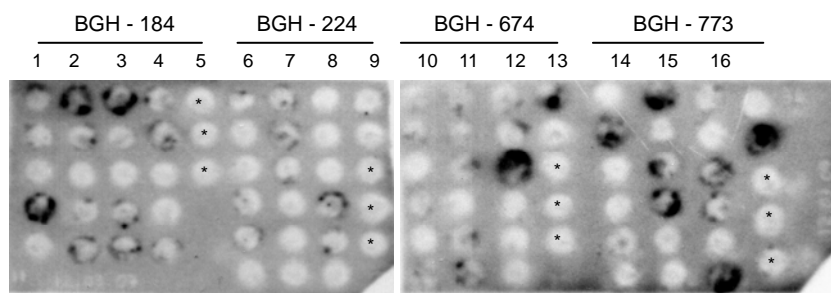


Figura 2. Detecção viral via hibridização molecular aos 30 d.p.i., utilizando como sonda um fragmento correspondente ao DNA-A do ToYSV marcada radioativamente. Vinte plantas por acesso. BGH-184 (1 a 5), BGH-224 (6 a 9), BGH-674 (10 a 13) e BGH-773 (14 a 17). (*) corresponde a 3 plantas não inoculadas como controle negativo para cada acesso.

O acesso BGH-224 se destacou por ter apenas 10% das plantas infectadas pelo vírus, valor confirmado pelo teste de hibridização (Figura 2). Foi observada redução do número de plantas infectadas pelo vírus inoculado da primeira para a terceira avaliação (Tabela 3), sendo o BGH-224 o acesso com a maior redução, de 10 plantas infectadas aos 10 dpi para 2 plantas infectadas aos 30 dpi. Provavelmente este resultado está associado a inadequabilidade de multiplicação do vírus neste genótipo.

No segundo e terceiro experimento foi possível avaliar sintomas de infecção por ToYSV de modo mais evidente, quando comparado com o método de agroinoculação empregado no primeiro experimento. Na maioria dos acessos suscetíveis o período de latência do vírus foi de 5 dpi. Já nos acessos com resistência moderada, os sintomas, de modo geral, foram evidentes a partir de 15 dpi (dados não mostrados), sugerindo a capacidade desses acessos de resistir ou impedir a replicação e movimento do vírus em seus tecidos.

Com exceção do sintoma de mosaico severo, que não foi observado nos acessos BGH-224 e BGH-773 (Tabela 4), os outros sintomas atribuídos ao vírus por Andrade *et al.* (2006) foram observados em todos os acessos. Foram observadas variações entre os acessos quanto à porcentagem da presença dos diferentes sintomas, o que evidencia as diferenças genéticas ou de tolerância ao vírus testado. Os sintomas de manchas cloróticas e encarquilhamento foliar foram os mais comuns, observados em 63,75 e 62,75% das plantas, respectivamente.

Tabela 4. Caracterização dos sintomas do ToYSV presentes aos 30 dias após inoculação em quatro acessos do BGH da UFV, inoculados via biobalística

Acessos	Porcentagem de plantas com sintoma (%) ¹					
	Mosaico leve	Mosaico severo	Epinastia	Manchas cloróticas	Emcarquilhamento foliar	Sem sintoma
BGH-184	60	15	75	80	80	20
BGH-224	50	0	15	50	50	50
BGH-674	25	50	80	75	75	25
BGH-773	50	0	5	50	45	50
Médias	46,25	16,25	43,75	63,75	62,5	36,25

¹ foram testadas 20 plantas por acessos.

DISCUSSÃO

Os acessos classificados como AS na primeira triagem representaram 59% do total de acessos avaliados. Apenas 8% dos acessos, foram classificados como MR. Resultados semelhantes foram obtidos por Picó *et al.* (2001), ao avaliar fontes de resistência ao *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) empregando como método de inoculação a agroinoculação com a estirpe *A. tumefaciens* LBA4404 em 8 genótipos de tomateiro. Esses autores constataram 100% das plantas infectadas para acessos de *L. pimpinellifolium*, *L. hirsutum* LA 1777 e *L. esculentum* FC já na segunda avaliação, o que evidencia a rápida infecção do TYLCV e a eficiência do método de inoculação empregado. Estes autores compararam o método de agroinoculação no caule em relação à agroinfiltração na folha, e encontraram diferenças no resultado da infecção entre os métodos, sendo a agroinoculação no caule mais eficiente na discriminação dos acessos testados, quando comparado com a agroinfiltração na folha.

Dos 31 acessos selecionados por agroinoculação com 100% das plantas inoculadas livres de vírus (fenotipados como Altamente Resistentes), apenas 9,6% dos acessos foram classificados como Resistentes (R) quando inoculados via biobalística. Isso evidencia que, dependendo do método de inoculação empregado, um grande número de escapes podem ocorrer.

Em muitos trabalhos, diversos protocolos têm sido desenvolvidos para testar acessos, cultivares e híbridos quanto à resistência a vírus de plantas. Dentre os mais empregados encontram-se a inoculação através do inseto vetor com populações

mantidas em casas-de-vegetação, agroinoculação ou agroinfiltração utilizando estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* e inoculação via biobalística. Diferenças na metodologia de inoculação tem contribuído para discrepâncias na seleção de acessos resistentes, verificado-se variações na resposta de diferentes genótipos ou espécies, inoculados por métodos diferentes (Calegario, 2004; Fernandes *et al.*, 2006; Matos *et al.*, 2003; Picó *et al.*, 1998; Piven *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2004; Tripathi & Varma, 2003).

Esses resultados coincidem com os obtidos neste experimento, e são principalmente devidos às diferenças dos métodos utilizados para a inoculação do vírus. A inoculação via biobalística foi mais eficiente em termos de infectividade dos acessos, sintomatologia e período latente, quando comparada com a agroinoculação. Porém, a agroinoculação consiste em um dos métodos mais eficientes quando se deseja inocular geminivírus em larga escala.

As variações observadas na reação dos acessos podem também ser justificadas pelo fato de se trabalhar com acessos do banco de germoplasma que constituem *landraces*, com uma elevada variabilidade dentro destes, pois cada acesso constitui na verdade uma mistura de linhas puras (Silva *et al.*, 2001), o que é manifestado na variação da porcentagem de infecção encontrada. Zakay *et al.* (1991), ao caracterizarem acessos de *L. esculentum* resistentes ao TYLCV, concluíram que uma das maiores dificuldades de selecionar fontes de resistência de material de bancos de germoplasma são as variações que existem no material empregado, que origina variações que podem ser expressas como diferentes graus de severidade da doença. Estes autores afirmaram também que sintomas nas espécies selvagens são geralmente muito mais fracos do que no tomateiro cultivado.

O período pós-inoculação é vital para o estabelecimento de uma doença ocasionada por vírus. Em muitos casos o hospedeiro pode ter fenótipo de recuperação devido à ativação de mecanismos de defesa como o silenciamento gênico pós-transcricional (Maule *et al.*, 2007). Essa interação vírus-hospedeiro pode ocasionar diferenças no desenvolvimento dos sintomas, que podem ser evidenciadas com a precocidade do aparecimento dos sintomas e/ou a sua intensidade. O período latente do ToYSV foi de 5 a 7 dpi quando inoculado via biobalística e de 15 dpi quando inoculados por agroinoculação. Com estes resultados pôde-se observar que a inoculação via biobalística foi mais eficiente, quando comparada a agroinoculação, ao discriminar melhor os acessos avaliados.

Resultados semelhantes foram obtidos por Tripathi & Varma (2003) caracterizando 90 acessos de *Lycopersicon spp.* encontraram variações na intensidade dos sinais obtidos no teste de hibridização para cada genótipo. De forma indireta, os autores detectaram que a replicação e o acúmulo do DNA viral foi superior quando empregada a agroinoculação, em comparação com a inoculação através do inseto vetor.

Com estes resultados se evidenciam as variações que podem ser encontradas quando se comparam diferentes métodos de inoculação em um mesmo material vegetal. Isto reforça as variações obtidas neste trabalho ao empregar dois métodos diferentes de inoculação (agroinoculação e biobalística).

Dos 96 acessos analisados no primeiro experimento, foram selecionados no segundo experimento os acessos BGH-184, BGH-224, BGH-674 e BGH-773 que segundo os resultados obtidos constituem possíveis fontes de resistência. O acesso BGH-224 se destacou na seleção como AR, com apenas 10% das plantas inoculadas com presença do vírus, no terceiro experimento.

Os acessos que tiveram entre 25 e 40% das plantas infectadas e foram classificados como MR poderiam ser propostos para estudos posteriores a fim de determinar não só neles, mas também no acesso BGH-224 o(s) gene(s) que conferem essa resistência e a possibilidade de serem incluídos em um programa de melhoramento.

Os 96 acessos avaliados nestes experimentos, foram também caracterizados quanto à resistência ao potivírus *Peper yellow mosaic virus* (PepYMV) segundo Juhasz *et al.* (2006). Nesta caracterização os autores verificaram que em 52 dos 355 acessos testados, incluindo BGH-184 e BGH-224, os sintomas visuais só foram detectáveis aos 30 dpi. Entretanto a detecção via ELISA indicou a presença do vírus em infecção latente em todos eles, não sendo considerados como fonte de resistência ao vírus testado, manifestando a capacidade deles de impedir a manifestação e danos causados pelo aparecimento de sintomas que comprometem a produção da cultura, confirmado também na caracterização deles ao isolado de ToYSV testado em nossos experimentos.

Ainda que o ToYSV tenha sido caracterizado como o mais severo dentre os begomovírus que infectam o tomateiro no Brasil, não se conhecem estudos que quantifiquem as perdas por ele causadas na cultura do tomateiro. Supoé-se que devido aos sintomas severos por ele induzidos, as perdas de produtividade sejam

consideráveis. Esse fato faz com que medidas de controle baseadas no emprego de fontes de resistência ao ToYSV sejam de suma importância para o controle da doença na cultura de tomateiro em áreas de produção.

Vários estudos reportam combinações distintas de begomovirus e espécies de *Lycopersicon* as quais sugerem que o controle gênico da resistência/tolerância dependem da combinação de acessos e de espécies de vírus (Ferraz *et al.*, 2003; Lapidot *et al.*, 2001).

Alto nível de resistência ao TYLCV foi encontrado em *L. chilense* por Zakay *et al.* (1991), sendo a resistência condicionada pelo gene Ty-1. Picó *et al.* (1999) trabalhando na seleção de linhagens resistentes a TYLCV obtiveram híbridos a partir da combinação de *L. esculentum* (susceptível) e *L. chilense* (resistente) com resistência dominante ao TYLCV.

Fontes de resistência a um isolado de geminivírus obtido em Brasília, DF, foram identificadas em acessos de *L. chilense*, *L. peruvianum* e *L. hirsutum*, com 0% de infecção em 3, 5 e 3 acessos respectivamente. Dentre destes, só um acesso para cada espécie foi classificado como livre do vírus, e nos demais acessos foi observada infecção latente detectada por meio de hibridização molecular (Santana *et al.*, 2001).

Resultados obtidos por Matos *et al.* (2003) evidenciaram a existência de variabilidade genética dentro do gênero *Lycopersicon* para resistência ao ToYVSV, havendo inclusive material comercial ('Franco' e 'Densus') resistente ao vírus testado, assim como linhagens selvagens, como LA 444-1 (*L. peruvianum*) e PI 134417 (*L. hirsutum*) e populações de origem interespecífica (série IAC 14-2) com níveis variáveis de resistência.

Giordano *et al.* (2005) avaliaram a herança de resistência ao *Tomato chlorotic mottle virus* derivada de *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking' ao cruzar com 'Ohio8245' (susceptível) e obtiveram diferentes padrões de segregação, com resistência e plantas suscetíveis ao avaliar a F₁ (0:1), BCP₁(retrocruzamento com o Pai 1)(1:1), BCP₂(retrocruzamento com o Pai 2) (0:1) e F₂(1:3).

Avaliando fontes de resistência a tospovírus e geminivírus Lourenção *et al.* (2004), caracterizaram linhagens de germoplasma com diferentes genealogias (*Stevens*, *TySw5*, *Gem Pride*, entre outros) e as cultivares *Stevens* (*L. esculentum* x *L. peruvianum*), *Franco* e *IPA-5*. Estes autores obtiveram diferentes padrões de infecção dentre o material testado para TCSV e ToYVSV, destacando-se a cultivar *Franco*, resistente para ambos os vírus.

A partir destes resultados mencionados anteriormente pode-se observar a ampla gama de espécies dentro do gênero *Lycopersicon* que têm sido caracterizadas como fonte de resistência a vírus (geminivírus e tospovírus), assim como também a insetos vetores de viroses (Baldin *et al.*, 2005; Fancelli *et al.*, 2003) e outros causadores de danos econômicos, como *Tuta absoluta* (Suinaga *et al.*, 2003; 2004). Dentre as espécies silvestres, as que são mais promissoras são os acessos de *L. hirsutum*, não somente por serem resistentes a grande número de insetos, mas também por serem cruzadas com certa facilidade com *L. esculentum* (Leite, 2004).

Na cultura do tomateiro a espécie *L. esculentum*, comparada às demais espécies silvestres, é mais suscetível à mosca branca por possuir maior densidade de tricomas tectores, mas do ponto de vista de melhoramento é mais adequada por ser a única espécie cultivada comercialmente (Leite, 2004), e que facilita a incorporação das fontes de resistência identificadas. Isto evidencia a importância das fontes de resistência a ToYSV obtidas a partir de acessos da espécie *L. esculentum* caracterizados neste trabalho, as quais podem ser facilmente incorporadas em programa de melhoramento do tomateiro.

Como parte também do processo sistemático de caracterização dos acessos do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV, do qual fazem parte os acessos avaliados nestes experimentos, os quatro acessos selecionados como possíveis fontes de resistência foram caracterizados agronomicamente por Marim & Silva (2005). A caracterização foi feita com base em descritores propostos pelo IPIGRI, sendo observada variabilidade desses acessos quanto à produção por planta, peso, formato e tamanho do fruto, como as características mais divergentes entre eles (disponível em www.ufv.br/bgh). Essas características avaliadas, somadas às obtidas no presente trabalho, apontam o acesso BGH-224 como candidato potencial para ser introduzido em um programa de melhoramento da cultura do tomateiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq, pela concessão de bolsa de pesquisa ao primeiro autor do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in

Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27:372-377. 2002.

Andrade, E.C., Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research* 7:153. 2002.

Andrade, E.C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. *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. 2006.

Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C. & Rech, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* 93:142-150. 1996.

Ausubel, F. M., R. Brent, Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.D., Smith, J.A., Struhl, K. Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley and Sons. 1991.

Baldin, E.L., Vendramim, J.D. & Lourenção, A.L. Resistência de Genótipos de Tomateiro à Mosca-Branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology* 34:435-441. 2005.

Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. & Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology* 125:311-325. 1994.

Calegario, R.F. Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível membro da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). Tese M.S., Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2004.

Cruz, C. Programa GENES: Análises multivariada e simulação. Viçosa: 250p. 2006.

Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21. 1983.

EMBRAPA. Mosca-branca e as geminiviroses do tomateiro. *Disponível em:* <http://www.cnpq.embrapa.br/public/folders/foldmb.html>. 2001

- Fancelli, M., Vendramim, J., Lourenção, A.L. & Dias, C. Atratividade e preferência para ovoposição de *Bermisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotipo B em genótipos de tomateiro. *Neotropical Entomology* 32:319-328. 2003.
- Faria, J.C., Bezerra, I.C., Zerbini, F.M., Ribeiro, S.G. & Lima, M.F. Situação atual das geminiviruses no Brasil. *Fitopatologia brasileira* 25:125-137. 2000.
- Faria, J.C., Souza-Dias, J.A.C., Slack, S. & Maxwell, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81:423. 1997.
- Fernandes, J.J., Carvalho, M.G., Andrade, E.C., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55:513-522. 2006.
- Ferraz, E., Resende, L.V., Lima, G.S., Silva, M.C., França, J.G. & Silva, D.J. Redenção: nova cultivar de tomate para a indústria resistente a geminivírus e tospovírus. *Horticultura Brasileira*. 21:578-580. 2003.
- Ferreira, P.T.O., Bezerra, I.C., Villas-Boas, G.L., Ribeiro, S.G. & Giordano, L.B. Avaliação de fontes de resistência a isolado de geminivírus com genoma bipartido transmitido por *Bemisia argentifolli* em *Lycopersicon spp.* *Fitopatologia Brasileira* 24:131-135. 1999.
- Freitas-Astúa, J., Purcifull, D.E., Polston, J.E. & Hiebert, E. Traditional and transgenic strategies for controlling tomato-infecting begomoviruses. *Fitopatologia Brasileira* 27:437-449. 2002.
- Gilbertson, R.L., Hidayat, S.H., Martinez, R.T., Leong, S.A., Faria, J.C., Morales, F.J. & Maxwell, D.P. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. *Plant Disease* 75:336-342. 1991.
- Giordano, L.B., Silva-Lobo, V.L., Santana, F.M., Fonseca, M.E.N. & Boiteux, L.S. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143:27-33. 2005.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T. & Walden, R. "Agroinfection", an alternative route for viral infection of plants by using the T-DNA plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 83:3282-3286. 1986.

- Juhasz, A.C.P., Da Silva, D.J.H., Zerbini, F.M., Soares, B.O. & Aguilera, G.A. Screening of *Lycopersicon* sp accessions for resistance to *Pepper yellow mosaic virus*. *Scientia Agricola* 63:510-512. 2006.
- Lapidot, M., Friedmann, M., Pilowsky, M., Ben-Joseph, R. & Cohen, S. Effect of host plant resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Phytopathology* 91:1209-1213. 2001.
- Leite, G.L. Resistência de tomates a pragas. *Unimontes Científica* 6:129-140. 2004.
- Lima, M.F., Bezerra, I.C., Ribeiro, S.G. & Ávila, A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale do São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 26:81-85. 2001.
- Lourenção, A.L., Melo, A.M., Siqueira, W.L., Colariccio, A. & Melo, P.C. Avaliação da resistência de acessos de tomateiro a tospovírus e a geminivírus. *Horticultura Brasileira* 22:193-196. 2004.
- Lourenção, A.L. & Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia* 53:53-59. 1994.
- Matos, E., Siqueira, W., Lourenção, A., Melo, A., Sawazaki, H., Sousa-Dias, J. & Colariccio, A. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 28:159-165. 2003.
- Maule, A.J., Caranta, C. & Boulton, M.I. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology* 8:223-231. 2007.
- Morales, F.J. & Jones, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100:57-65. 2004.
- Melo, P. C. T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil, Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin. 1992.
- Naranjo, S.E. & Ellsworth, P.C. Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Protection* 20:707. 2001.
- Picó, B., Diez, M.J. & Nuez, F. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Euphytica* 101:259-271. 1998.
- Picó, B., Ferriol, M., Diez, M.J. & Nuez, F. Developing tomato breeding lines resistant to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Breeding* 118:537-542. 1999.

- Picó, B., Ferriol, M., Díez, M.J. & Viñals, F.N. Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Plant Pathology* 83:215-220. 2001.
- Piven, N.M., Uzcátegui, R.C. & Infante, D.H. Resistance to *Tomato yellow mosaic virus* in species of *Lycopersicon*. *Plant Disease* 79:590-594. 1995.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicus, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. & Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148:281-295. 2003.
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russell, D.R. & Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347. 1993.
- Santana, F.M., Ribeiro, S.G., Moita, A.W., Moreira, D.J. & Giordano, L.B. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivírus from Brazil. *Euphytica* 122:45-51. 2001.
- Santos, C.D., Ávila, A.C. & Resende, R.O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira* 28:664-673. 2003.
- Santos, C.D.G., Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K. & Resende, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 29:450-455. 2004.
- Silva, D.J., Moura, M.C. & Casali, V.W. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta. *Horticultura Brasileira* 19:108-114. 2001.
- Suinaga, F.A., Casali, V.W., Picanço, M.C. & Silva, D.J. Capacidade combinatória de sete caracteres de resistência de *Lycopersicon* spp. à traça do tomateiro. *Horticultura Brasileira* 22.:243-248. 2004.
- Suinaga, F.A., Casali, V.W., Silva, D.J. & Picanço, M.C. Dissimilaridade genética defontes de resistência de *Lycopersicon* spp. a *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Brasileira de Agrociência* 9:371-376. 2003.
- Tripathi, S. & Varma, A. Identification of sources of resistance in *Lycopersicon* species to *Tomato leaf curl geminivirus* (ToLCV) by agroinoculation. *Euphytica*

129:43-52. 2003.

Villas-Bôas, G. L., França, F. H., & Macedo, N. Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. *Horticultura Brasileira*, 20 (1), 71-79. 2002.

Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Kedar, N., Rabinowitch, H., Czosnek, H. & Zamir, D. Screening *Lycopersicon* Accessions for Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus: Presence of Viral DNA and Symptom Development. *Plant Disease* 75:279-281. 1991.

Zerbini, F.M. Manejo de viroses: um desafio para o produtor e para o pesquisador. *Fitopatologia Brasileira* 31:S11-S13. 2006.

ARTIGO II - Caracterização da diversidade de acessos de *L.esculentum* empregando marcadores moleculares ISSR.

RESUMO

O grande número e variabilidade dos acessos de uma coleção de germoplasma constituem limitações práticas no processo de caracterização molecular, sendo necessário o emprego de técnicas rápidas e simples como estratégias apropriadas para fazer a avaliação da variabilidade destes. Neste estudo foram usados marcadores moleculares ISSR para avaliar a variabilidade genética de 96 acessos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Os acessos foram semeados em casa de vegetação e folhas de três plantas por acesso foram coletadas para extração em bulk do DNA. Dez marcadores moleculares ISSR ancorados foram empregados. Os marcadores ISSR geraram, em conjunto, 53 bandas polimórficas de um total de 144 amplificadas. O *primer* 840 gerou o maior número de bandas polimórficas, com 18 % (13 bandas) das 144 bandas obtidas pelos 10 *primers* empregados. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 250 a 2000 pb. Mediante a avaliação do dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA e o agrupamento pelo método Tocher, foi possível diferenciar os acessos. O acesso BGH-980 foi classificado em um grupo isoladamente, sendo o mais divergente dos acessos testados. Foram classificados em grupos com 2 acessos pelo UPGMA e agrupados em grupos iguais pelo Tocher os pares de acessos BGH-674 e BGH-991, BGH-616 e BGH-970, ainda que semelhantes geneticamente não constituem acessos duplicados. Os marcadores ISSR foram úteis na caracterização da variabilidade dos acessos de *Lycopersicon esculentum*, amplificando número relativamente elevado de locos por *primer*, sendo suficiente para discriminar os acessos avaliados.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, variabilidade genética, banco de germoplasma, Distância genética.

ABSTRACT

Characterization of the diversity of accesses of *L. esculentum* using molecular markers ISSR. González, J.A., Pessoni, L.A., Silva, D.J.H. & Barros, E.G.

The great number and variability of the accesses of a germplasm collection constitute limitations practices in the process of molecular characterization, being necessary the job of fast and simple techniques as appropriate strategies. In this studio, to molecular markers ISSR were used to reveal the genetic variability of 96 tomato accesses (*Lycopersicon esculentum* Mill.). The accesses were sowed in vegetation house and leaves of three plants by access were collected for extraction in bulk of DNA. Ten molecular markers anchored ISSR were used. The markers ISSR generated, together, 53 bands polimórficas of a total of 144 amplified. The primer 840 generated the largest number of bands, with a 18% (13 bands) of the total of bands obtained polimórficas. The primers 812, 835, 841 and 889, they generated the smallest number of bands, with only 2 bands polymorphism of the total of analyzed bands. The width of size of the amplified fragments varied from 250 to 2000 pb. The dendrogram obtained by the grouping method UPGMA allowed differentiating the accesses being the accesses 21 and 42 classified separately, the rest of the accesses formed groups from 2 to 4 accesses for group. Through the head of Jaccard coefficient the grouping of the accesses was accomplished by the method Tocher, being possible to form 46 groups, contained most of the accesses in groups of two accesses. The markers ISSR were useful in the characterization of accesses of *Lycopersicon esculentum*, amplifying relatively high number of locos for primer, being enough to discriminate the appraised accesses.

Key-Word: *Lycopersicon esculentum*, geminivirus, genetic variability, ISSR, bank of germoplasma.

INTRODUÇÃO

O tomateiro cultivado, *Lycopersicon esculentum* Mill., pertence à família Solanaceae, família extremamente ampla e diversificada, abrangendo muitas espécies de cultivo comum (batata, pimentão, berinjela, petúnia), além de plantas daninhas como a beladona e a erva-moura. Essas espécies estão abrangidas em cerca de 90 gêneros (D'arcy, 1979), os quais são divididos em duas subfamílias, Solanaceae e Cestoideae, com base nos padrões de desenvolvimento do embrião (Taylor, 1986).

Com o crescente aumento da erosão dos recursos genéticos vegetais ocorreu a redução da variabilidade genética de espécies cultivadas e de seus parentes silvestres (Silva, 2001). Esse fato é uma evidência da urgente necessidade de conservação e utilização dos recursos genéticos vegetais de maneira sustentável visando garantir o desenvolvimento da agricultura, de modo a beneficiar as gerações presentes e futuras. A FAO, no ano 1996, identificou cerca de 1.300 bancos de germoplasma, preservando mais de 5.5 milhões de acessos; dentre eles, 78.000 acessos de tomate (Fraleigh, 2006).

Os bancos de germoplasma constituem uma forma de conservação *ex situ* dos recursos genéticos. Para que esses recursos sejam disponibilizados para a comunidade científica é necessário caracterizá-los, avaliá-los e catalogá-los. A caracterização e avaliação de germoplasma visa, em uma primeira instância, gerar subsídios para facilitar as decisões dos curadores de Bancos de Germoplasma com relação às amostras repetidas. Gerar, ainda, subsídios para programas de melhoramento genético e para o conhecimento da própria riqueza genética da coleção. Classicamente, a caracterização de germoplasma tem sido baseada em descritores morfológicos e, em menor escala, em características de interesse agrônomo. O advento das técnicas moleculares, inicialmente com o uso de isoenzimas, e posteriormente, com as técnicas baseadas na avaliação direta de variações na sequência de DNA, abriu novos horizontes nesta área. Assim, pode-se avaliar a variabilidade genética que podem ser reveladas usando ensaios baseados em DNA, que constituem só uma parte secundária da contribuição das técnicas moleculares com relevância no contexto da diversidade genéti-

ca. Além da informação sobre diversidade genética que podem ser derivadas, junto com a qualidade, velocidade e eficiência com o qual podem ser obtidas, as informações podem ser usadas por geneticistas ou curadores de recursos genéticos, para ajudar nas tomadas de decisões, onde os benefícios das técnicas moleculares podem ser de elevado valor prático (Karp, 2002).

O genoma do tomateiro é um dos mais investigados dentre os vegetais, sendo obtido amplo número de marcadores moleculares (Tikunov *et al.*, 2003; Kocheiva *et al.*, 2002a; 2002b). Entretanto, segundo Tikunov *et al.* (2003) a contínua procura por novos marcadores com um elevado grau de polimorfismo molecular é essencial.

Os ISSRs (“*inter-simple sequence repeats*”) ou também denominados ISA (“*Inter-SSR amplification*”), amplificam regiões entre locos de SSR (pequenas seqüências de 2-5 pares de bases) e não requerem seqüências conhecidas, evidenciando elevado polimorfismo no material caracterizado, sendo muito úteis em estudos de diversidade genética, filogenia, genômica e biologia evolutiva (Reddy *et al.*, 2002). Os marcadores ISSR estão sendo utilizados por vários autores na caracterização molecular de numerosas espécies vegetais como tomate (Tikunov *et al.*, 2003), arroz (Saini *et al.*, 2004), batata (Prevost & Wilkinson, 1999), feijão (Marotti *et al.*, 2007), milho (Osipova *et al.*, 2003), café (Masumbuko & Bryngelsson, 2006), cevada (Tanyolac, 2003) entre outras culturas (Manimekalai & Nagarajan, 2006, Belaid *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Liu & Wang, 2006; Martins-Lopes *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2007). Quando comparados com os marcadores SSR (Goulão & Oliveira, 2001), AFLP (Hodkinson *et al.*, 2002; Saini *et al.*, 2004), RFLP (Nagaoka & Ogihara, 1997) e RAPD (Tanyolac, 2003; Souframanien & Gopalakrishna, 2004; Marotti *et al.*, 2007) os marcadores ISSR foram considerados mais eficientes ao reproduzir um número maior de bandas polimórficas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética, a partir de dados moleculares, de 96 acessos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), do BGH da UFV.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal.

Foram utilizados 96 acessos de *Lycopersicon esculentum* pertencentes à coleção do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e duas testemunhas, as variedades comerciais ‘Santa Clara’ e o híbrido ‘Débora’ (Tabela1).

Tabela 1: Listado e código dos acessos do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV no BIOAGRO, empregados neste trabalho.

Código BIOAGRO	Acesso	Código BIOAGRO	Acesso
1	BGH 24	51	BGH 994
2	BGH 55	52	BGH 997
3	BGH 83	53	BGH 1019
4	BGH 121	54	BGH 1020
5	BGH 160 Salada	55	BGH 1211
6	BGH 160 Santa Cruz	56	BGH 1214
7	BGH 161	58	BGH 1254
8	BGH 166	59	BGH 1282
9	BGH 168	60	BGH 1485
10	BGH 181	61	BGH 1490
11	BGH 184	62	BGH 1497
12	BGH 185	63	BGH 1498
13	BGH 186	64	BGH 1499
14	BGH 216	65	BGH 1532
15	BGH 218	66	BGH 1538
16	BGH 224	67	BGH 1706
17	BGH 225	68	BGH 1708
18	BGH 227	69	BGH 1985
19	BGH 243	70	BGH 1987
20	BGH 279	71	BGH 1988
21	BGH 320	72	BGH 1989
22	BGH 322	73	BGH 1990
23	BGH 327	74	BGH 1991
24	BGH 349	75	BGH 1992
25	BGH 351	76	BGH 1993

..... Continuação

26	BGH 378	77	BGH 2000
----	---------	----	----------

27	BGH 406 Salada	78	BGH 2119
28	BGH406 Santa Cruz	79	BGH 2202
29	BGH 468	80	BGH 2203
30	BGH 489	81	BGH 2205
31	BGH 603	82	BGH 2208
32	BGH 606	83	BGH 2211
33	BGH 616	84	BGH 2213
34	BGH 674	85	BGH 2214
35	BGH 700	86	BGH 2216
36	BGH 773	87	BGH 2219
38	BGH 850	88	BGH 2223
39	BGH 970	89	BGH 2229
40	BGH 975	90	BGH 2234
41	BGH 978	91	BGH 3472
42	BGH 980	92	BGH 4006
43	BGH 981	93	BGH 4035
44	BGH 985	94	BGH 4053
45	BGH 987	95	BGH 4054
46	BGH 989	96	BGH 4055
47	BGH 990	97	BGH 4206
48	BGH 991	98	BGH 4309
49	BGH 992	99	* Débora
50	BGH 993	100	* Santa Clara

*: Testemunhas.

Condições experimentais.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular de Plantas (BIOMOL) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV. A produção de mudas foi feita em bandejas de isopor na estufa de produção de mudas da Horta Velha, setor de Olericultura da UFV, empregando-se o substrato comercial BIOPLANT[®]. Após a germinação, as plantulas foram mantidas por 30 dias nas bandejas, quando foram transplantadas para vasos de um litro de capacidade, com substrato composto de uma mistura de terra e esterco bovino 3:1, previamente esterilizado, plantando uma muda por vaso.

Extração de DNA.

Folhas de três plantas por acesso foram coletadas e congeladas a -80°C. A extração do DNA foi realizada de três folhas em bulk do DNA segundo Doyle (1990), com algumas modificações. Folhas foram maceradas em presença de N₂ líquido, utilizando almofariz de porcelana. O pó resultante foi transferido para um tubo “Eppendorf” de 2ml de volume, previamente identificado e também congelado em nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado 900 µl de tampão de extração, composto da seguinte mistura: 50mM de Tris-HCl pH 8,0, 50mM de EDTA

(*ethylenediaminetetracetate*), 0,7M de NaCl 2% (p/v) de CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) e 0,2% (v/v) de β -Mercaptoetanol sendo este último adicionado separado dos demais componentes. O material foi homogeneizado em vortex e incubado em banho-maria a 65°C por 20 minutos, com uma leve agitação cada 10 minutos. Após a incubação, as proteínas foram removidas pela extração com igual volume de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1) e centrifugação a 14.000 rpm em Centrífuga Eppendorf Modelo-5415C. Depois de centrifugado, a fase aquosa foi transferida para outro tubo de eppendorf de 1,5ml previamente identificado. Os ácidos nucleicos foram então precipitados da fase aquosa, pela adição de 2/3 do volume obtido de isopropanol gelado e mantidos a -4 °C durante pelo menos 2 horas. Passado esse tempo, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos para precipitar o DNA com o posterior descarte da fase aquosa. Depois de eliminada a fase aquosa dos tubos, os precipitados foram lavados com etanol (95%) gelado e secados à temperatura ambiente. Os precipitados foram resuspenso em 30 μ l de TE (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA pH 8,0) contendo RNase na concentração final de 30 μ g/ml e incubados a 37°C por 30 minutos.

Quantificação e qualidade do DNA

A avaliação da concentração e da qualidade do DNA das amostras foi estimada em geis de agarose na concentração de 0.8 % (p/v), por meio de comparação visual com mostras de DNA do fago λ de concentrações conhecidas (10, 50 e 100 ng). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotodigitalizados pelo sistema de captura de imagens 'Eagle Eye' (Stratagene). Uma vez quantificado o DNA, foram feitas diluições de cada acesso a fim de ficarem na concentração final de 10 ng/ μ L. para ser usados posteriormente nas reações de PCR. Tanto o DNA estoque quanto as amostras de trabalho foram mantidas a -20°C.

Condições de amplificação e separação dos fragmentos.

Um total de 16 *primers* ancorados ISSR (Tabela 2), que produziram melhores amplificações em termos de quantidade e nitidez de bandas, foram pré-selecionados para determinação da melhor temperatura de pareamento e nível de polimorfismo produzido. A temperatura de pareamento testada foi entre 47 a 57°C, utilizando termociclador de gradiente modelo 'Robocycler Gradient 96' (Stratagene). Apenas dez *primers* ancorados foram utilizados no trabalho final de amplificação de todas as amostras, sendo selecionada a temperatura que gerou um padrão de amplificação de bandas mais nítido.

Tabela 2. Relação de *primers* de marcadores ISSR avaliados em ampliações de DNA genômico de *Lycopersicon esculentum*

<i>Primers</i>	Seqüência completa (5' -3')	Nº de nucleotídeos	T _p (°C)
808-(AG) ₈ C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	17	49-56
*810-(GA) ₈ T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	17	47-54
*812-(GA) ₈ A	GAGAGAGAGAGAGAGAA	17	47-54
827-(AC) ₈ G	ACACACACACACACG	17	49-56
834-(AG) ₈ YT	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	18	49-56
*835-(AG) ₈ YC	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	18	50-57
836--(AG) ₈ YA	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	18	49-56
*840-(GA) ₈ YT	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	18	49-57
*841-(GA) ₈ YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	18	50-57
842-(GA) ₈ YG	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	18	50-57
*855-(AC) ₈ YT	ACACACACACACACACYT	18	49-55
*884 -HBH(AG) ₇	HBHAGAGAGAGAGAGAG	17	48-55
*885- BHB(GA) ₇	BHBGAGAGAGAGAGAGA	17	48-56
886-VDV(CT) ₇	VDVCTCTCTCTCTCTCT	17	48-56
*888 -BDB (CA) ₇	BDBCACACACACACACA	17	48-56
*889 -BDB (AC) ₇	BDBACACACACACACAC	17	48-55

**Primers* efetivamente utilizados no trabalho,
T_p= Intervalo de temperatura de pareamento testado,
Y= (C ou T); H= (A, C ou T); B= (C, G ou T); D= (A, G ou T); V= (A, C ou G).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 15 µl contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2,4 mM, 0,25 µM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,5 µM de *primer*, 0,6 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase, 0,5% de BSA (albumina de soro bovino) e 20 ng de DNA. As ampliações foram realizadas em termociclador modelo 'GeneAmp PCR System 9600' (Applied Biosystem 9600), programado para uma etapa inicial de desnaturação de 4 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), pareamento (1 min a temperatura dependente do *primer*) e extensão (2 min a 72°C). Por fim, uma fase de extensão final de 7 min a 72°C.

Resolução e visualização dos fragmentos amplificados.

Os produtos de amplificação foram separados e visualizados em gel 1,2% (p/v) de agarose ultra pura (Invitrogen) em tampão TBE 1X. Os produtos de reação de PCR (volume 15µl) foram misturados com 3µl do corante Tipo IV e o volume

resultante foi aplicado a cada um dos poços. Em seguida, a separação eletroforética foi de aproximadamente quatro horas, a 4 V/cm. Em todos os géis foram aplicados 3µl de marcador de 100 pares de bases (Invitrogen), na concentração de 0,1µg/µl. Os géis foram corados com brometo de etídeo a razão de 7µl por cada 350 ml de tampão TBE 1X. Depois da corrida, os géis foram fotodigitalizados sob luz ultravioleta no sistema de fotodocumentação Eagle-Eye II (Stratagene).

Dissimilaridade Genética.

A interpretação dos padrões de bandas exibidos pelos géis foi realizada pela atribuição de 1 à presença e 0 à ausência de banda para cada posição relativa. A ausência do produto de amplificação foi usada como critério para considerar o marcador polimórfico. Com as bandas analisadas para cada *primer*, foi construída a matriz de dados binários, empregada no cálculo da dissimilaridade entre pares de acessos, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard (Cruz & Carneiro, 2003), sendo a expressão:

$$S_{ii'} = \frac{a}{a + b + c}$$

Onde:

$S_{ii'}$: similaridade entre o acesso i e i' ;

a: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 1-1 para cada par de acessos;

b: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 1-0 para cada par de acessos;

c: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 0-1 para cada par de acessos.

Foi empregado o complemento ($1 - S_{ii'}$) na construção de matrizes de dissimilaridade entre os acessos. A partir da matriz de dados binários também foi obtido a porcentagem de polimorfismo de cada primers, obtida pela equação:

$$P = \frac{NBP}{NBT} \times 100$$

Onde:

P: porcentagem de locos polimórficos;

NBP: número de bandas polimórficas;

NBT: números totais de bandas.

Analises de agrupamentos entre os acessos.

Os dados da matriz de dados binários foram usados para construir a matriz de dissimilaridade genética entre os acessos, utilizada para realizar o agrupamento dos acessos pelos métodos de otimização de Tocher e pelo método hierárquico UPGMA (Cruz & Carneiro, 2003).

Analises discriminante.

A matriz de dados binários foi empregada no análise discriminante, baseado no método paramétrico de *k vizinhos mais próximos* considerando a similaridade do indivíduo em relação a K mais próximos (k=3) originários de populações diversas. Foi empregado também o método de *Distância média* do indivíduo em relação a cada população. O análise foi realizado considerando como populações a origem geográfica como critério de discriminação.

Foi realizado o análise discriminante considerando a origem geográfica como critério de classificação *a priori* de 86 acessos, possibilitando a alocação previa dos acessos em:

- a) 5 populações
 - 1-Sudeste (35 acessos),
 - 2-Centro Oeste (11 acessos),
 - 3-Sul (2 acessos),
 - 4-Nordeste (16 acessos),
 - 5-EU(22 acessos)

- b) 2 populações
 - 1-Brasil (64 acessos)
 - 2-EU (22 acessos)

Os 12 acessos remanescentes foram alocados a *posteriori* (Tabela 3), uma vez que não foram classificados inicialmente no dado de passaporte deles no Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (Marim & Silva, 2005).

Tabela 3. Distribuição, segundo a origem de coleta, de 96 acessos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) do BGH-UFV.

Pais de Origem	Região	Estado	Acessos
Brasil	Sudeste	Minas Gerais	1, 31, 33, 34, 53, 54, 55, 65, 92, 98
		São Paulo	39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 67
		Espírito Santo	38, 94, 95, 96
	Centro Oeste	Goiás	21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 58, 66
	Sul	Mato Grosso	36, 56
		Paraná	59
	Nordeste	Rio Grande do Sul	60
		Bahia	2, 3, 4, 5, 6, 7, 16, 17, 18,
		Alagoas	9
	EUA	Indiana	Pernambuco
69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90			
Carolina do Norte		91	
Origem Desconhecida			8, 10, 20, 22, 29, 30, 35, 77, 93, 97

Todas análises foram realizadas utilizando o aplicativo computacional GENES (Cruz, 2006).

RESULTADOS

Os diferentes sítios de origem de coleta dos 96 acessos de tomateiro empregados neste trabalho são mostrados na Tabela 3. Os sítios de coleta estão distribuídos por 10 estados brasileiros, representando 4 regiões do país, além de dois sítios localizados em dois estados dos Estados Unidos.

Dez *primers* ISSRs, ancorados com um a três nucleotídeos, foram selecionados e empregados na caracterização da divergência genética de 96 acessos de *Lycopersicon esculentum* (Tabela 4). Nesta Tabela são informadas as respectivas temperaturas de pareamento dos *primers*, o número de bandas ou locos amplificados, o número de locos polimórficos, o percentual de polimorfismo e a amplitude dos fragmentos amplificados. No total foram amplificadas 144 bandas e delas 53 foram polimórficas, representando 36,8% do total de locos amplificados.

De modo geral foi observado elevado número de bandas por *primer*, com mediano grau de polimorfismo, com exceção aos *primers* 810, 855 e 840, que revelaram alto grau de polimorfismo representado por 50, 60 e 72% de bandas polimórficas, respectivamente. Os *primers* 812, 835, 841 e 889 geraram o menor número de bandas, com apenas 2 bandas polimórficas do total de bandas analisadas (Tabela 4). A porcentagem de bandas polimórficas variou de 15 a 72 % do total de bandas amplificadas e o tamanho dos fragmentos amplificados variou de 250 a 2000pb.

Dentre os *primers* selecionados e efetivamente empregados em nosso trabalho, prevaleceu o motivo 'GA' presente em 5 dos 10 *primers* selecionados. *Primers* com motivos iguais, mas diferindo apenas nas seqüências de ancoragem, produziram perfis de amplificação muito diferentes, como também NBT, NBP e P diferentes (Tabela 4).

Tabela 4. Relação de *primers* ISSR utilizados na avaliação da divergência genética de 98 acessos de *L. esculentum* do BGH-UFV, com respectivas temperaturas de pareamento (T_p), número de bandas totais amplificadas (NBT), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P) e o tamanho dos fragmentos amplificados em pares de base (pb),

<i>Primer</i> ^a	T_p (°C)	NBT	NBP	P (%)	Tamanho dos Fragmentos (pb)
810-(GA) ₈ T	51	22	11	50,00	300-2000
812-(GA) ₈ A	50	10	2	20,00	300-1100
835-(AG) ₈ YG	52	9	2	22,22	250-1000
840-(GA) ₈ YT	51	18	13	72,22	500-2000
841-(GA) ₈ YC	51	9	2	22,22	300-1000
855-(AC) ₈ YT	52	15	9	60,00	320-1200
884-HBH(AG) ₇	51	15	4	26,67	250-1450
885-BHB(GA) ₇	51	19	3	15,79	250-2000
888-BDB (CA) ₇	51	14	5	35,71	300-1200
889-BDB (AC) ₇	54	13	2	15,38	300-1200
Total		144	53		

^a: Y= (C ou T); H= (A, C ou T); B= (C, G ou T); D= (A, G ou T).

Os padrões de amplificação produzidos para dois *primers* com motivos diferentes, dos dez *primers* empregados, são mostrados na Figura 1. Prioritariamente bandas intensas foram avaliadas embora bandas de mais baixa intensidade, mas com alta reprodutibilidade, também foram incluídas nas análises, sendo este o principal fator considerado na seleção da temperatura de pareamento dos *primers*.

Baseado nos resultados das análises dos locos marcadores ISSR, foi construído a partir do complemento do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard o dendrograma pelo método hierárquico UPGMA e formado o agrupamento pelo método de otimização de Tocher.

No dendrograma UPGMA foi observada a discriminação da maioria dos acessos avaliados, mostrando claramente que o acesso 42 (BGH-980) é o mais divergente, ao ser diferenciado dos outros acessos (Figura 2) quando avaliados a 100% de dissimilaridade por ambos os métodos.

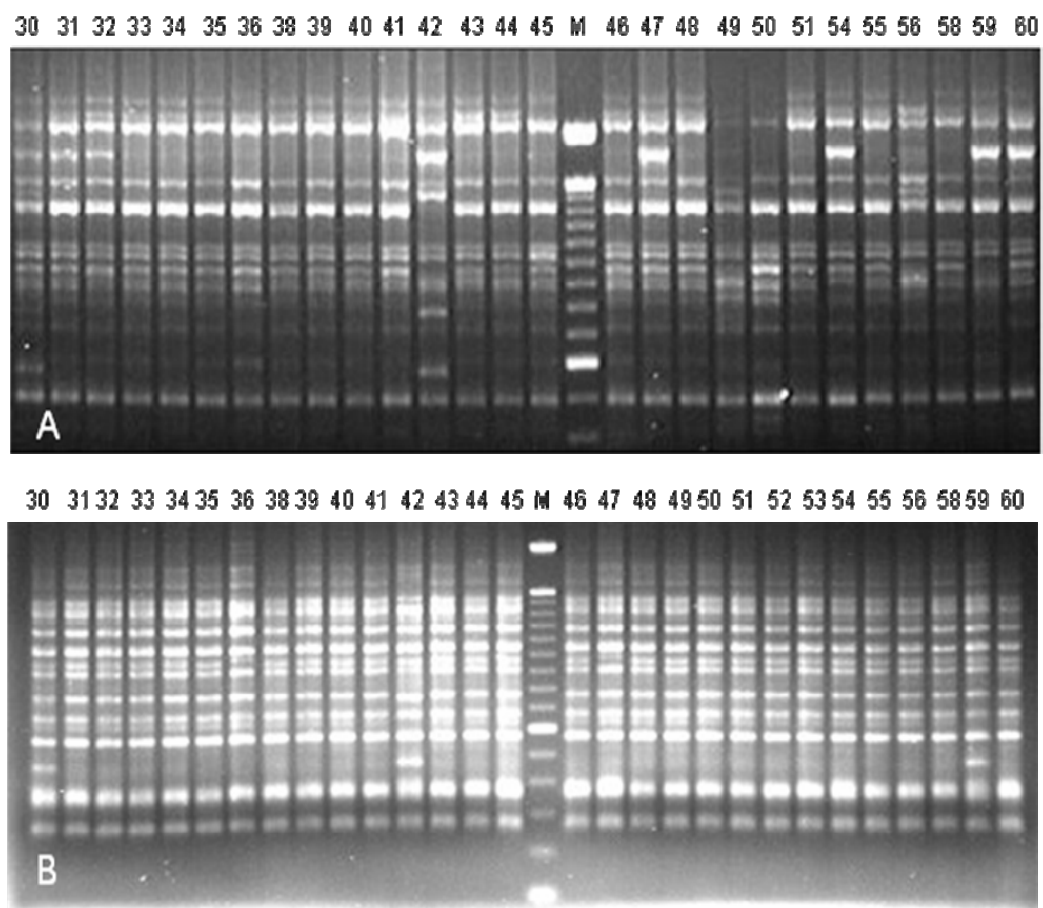


Figura 1. Eletroforese em géis de agarose (1,2 %) corados com brometo de etídeo, que mostra as diferenças nos perfis das bandas amplificadas pelos *primers* 840-(GA)₈YT (A) e 884-HBH(AG)₇ (B), em DNA nuclear de acessos de *L. esculentum*. Os números identificam os acessos e M o marcador de 100 pb (Invitrogen).

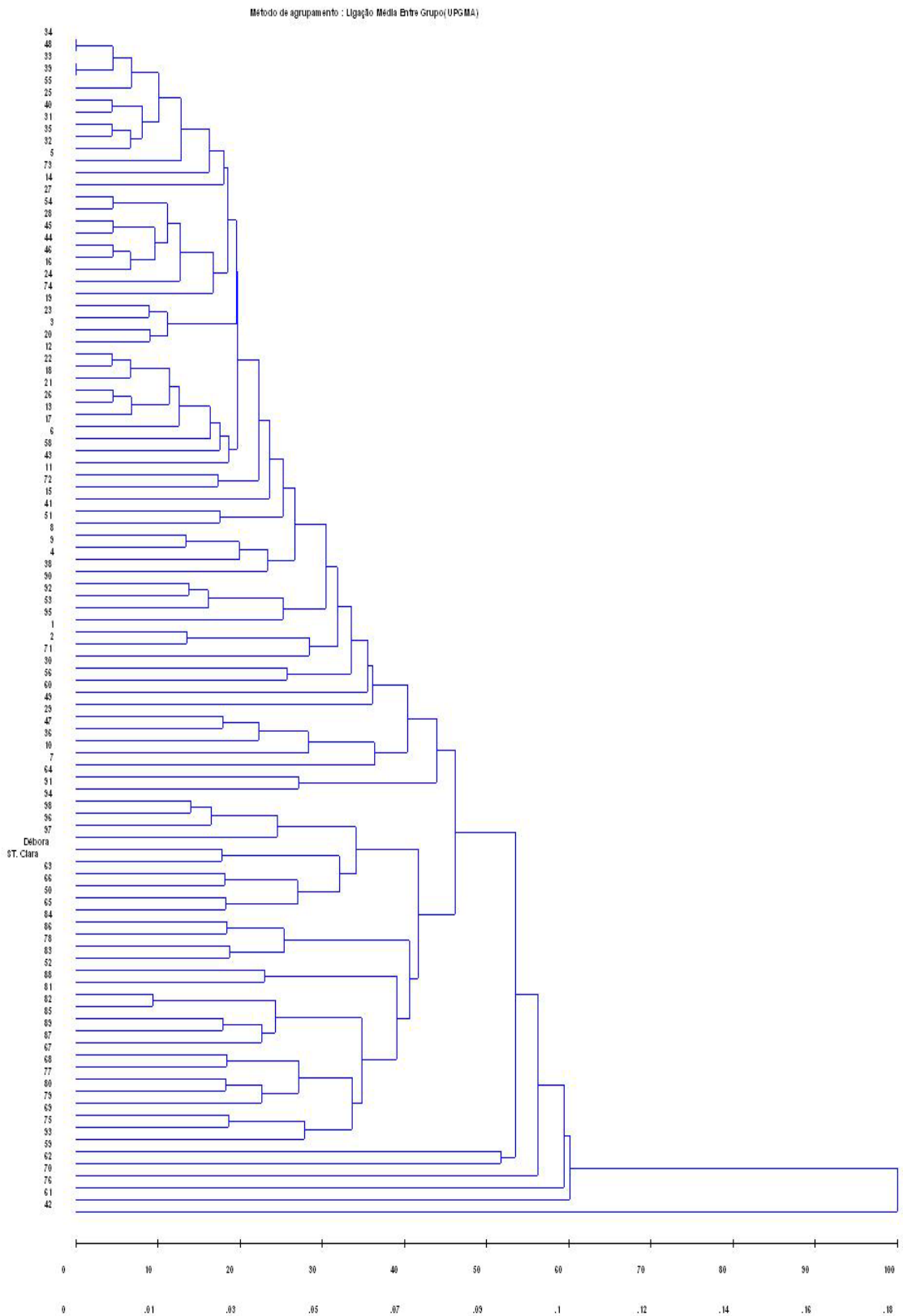


Figura 2. Dendrograma UPGMA obtido a partir da matriz de dissimilaridade de 96 acessos e dois cultivares comerciais de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) do BGH da UFV, considerando 144 locos marcadores ISSR.

Foram classificados em grupos com 2 acessos pelo UPGMA (Figura 2) e agrupados em grupos iguais pelo Tocher (Tabela 6), os dois pares de acessos 34 (BGH-674) e 48 (BGH-991), 33 (BGH-616) e 39 (BGH-970). Na Tabela 5 são mostrados os valores de 11 características: 4 qualitativas (R, C, TF, FF), 6 quantitativas (CR, CE, PF, NF, PT, SS) e a origem (Or) desses quatro acessos obtidos por Marim & Silva (2005), quando feita à caracterização agrônômica de 100 acessos, deles 96 empregados em nosso trabalho. Os dados referentes à fenotipagem de resistência a um isolado de geminivírus constituem resultados do primeiro Artigo.

Os dados mostrados na Tabela 5 evidenciam a possibilidade que os acessos têm de serem considerados acessos duplicatas, devido à: a) proximidade da origem de coleta, b) poucas diferenças nos dados referentes as características quantitativas e qualitativas mostradas e c) a o resultado do agrupamento UPGMA tendo como base os locos amplificados por marcadores ISSR. Porém, avaliando de modo isolado não dá para ter uma precisão do melhor critério a considerar para definir eles como duplicatas, já que cada característica acusa a um resultado diferente. A seguridade poderá ser alcançada ao avaliar os acessos com essas mesmas características, mais empregando um método de agrupamento (Tocher, UPGMA, etc.) ou análises discriminantes (Anderson ou Componentes Principais) que considere as múltiplas categorias (características diferentes) disponíveis, podendo dar um resultado mais conclusivo.

Tabela 5. Dados das características: origem (Or), comprimento do ráquis (CR), comprimento do entrenó (CE), peso do fruto (PF), número de frutos (NF), produção total (PT), sólidos solúveis totais (SS), fenotipagem de resistência a um geminivírus (R), cor (C), tipo de fruto (TF) e formato de fruto (FF), de quatro acessos do BGH da UFV,

Acesso	Or	CR (cm)	CE (cm)	PF (g)	NF	PT (g/plt.)	SS (°Brix)	R ¹	C ²	TF ³	FF ⁴
33 (BGH-616)	MG	30.47	58.52	67.94	9.01	4125	3.33	4	1	1	1
39 (BGH-970)	SP	31.08	73.4	78	7.32	2537	5.03	4	1	1	1
34 (BGH-674)	MG	29.83	53.88	79.44	7.28	3088	3.8	2	1	1	1
48 (BGH-991)	SP	32.33	63.4	85.5	6.95	2205	4.78	4	1	2	1

¹: 2-moderadamente resistente, 4- altamente suscetível; ²: 1-vermelho; ³: 1-pequeno, 2-intermédio;

⁴: 1- arredondado. Adaptada de Marim & Silva (2005).

A partir da matriz de dissimilaridade de Jaccard, foi realizado o agrupamento

pelo método Tocher permitindo formar 2 grupos, sendo um grupo formado apenas por o acesso 42 e o outro grupo formado pelo resto dos acessos avaliados (Tabela 6), confirmando o resultado mostrado pelo UPGMA. Realizando um reagrupamento e excluindo do análises o acesso 42, são formados 13 Sub-grupos dentre o Grupo I (Tabela 6) o que evidência os diferentes níveis de dissimilaridades contatados dentre do Grupo I inicialmente formado.

A cultivar ‘Santa Clara’ e o híbrido ‘Débora’ empregados como testemunhas, foram agrupados bem próximos pelo UPGMA e agrupados em um mesmo Grupo e diferentes Sub-grupos pelo método de Tocher, evidenciando o baixo nível de dissimilaridade acessado pelos marcadores entre eles, sendo um resultado esperado ao serem esses cultivares comerciais resultado do melhoramento, manifestado pelo estreitamento da base genética deles.

Tabela 6. Agrupamento pelo método de Tocher, obtido a partir da matriz de dissimilaridade de Jaccard, considerando 144 locos marcadores ISSR.

Grupo	Sub-Grupo	Acessos
I	1.1	33, 39, 25, 34, 48, 35, 45, 28, 31, 32, 40, 26, 55, 44, 18, 21, 13, 3, 19, 20, 27, 46, 16, 24, 12, 17, 22, 73, 43, 5, 54, 6, 11, 14, 72, 74, 15, 90, 41, 23, 9, 4, 38, 50, 51, 58, 1, 8, 53, 89, 56, 47, 29, 92, 95, 71, 2, 60, 63, 65, 49, 94, 30
	1.2	81, 82, 85, 87, 68, 80, 79, 75, 77, 78, 69, 67, 88, 66, 53, 84, 96, 98, Santa Clara
	1.3	64, 91
	1.4	10, 36
	1.5	83, 86
	1.6	97, Débora
	1.7	93
	1.8	59
	1.9	76
	1.10	62
	1.11	61
	1.12	7
	1.13	70
II		42

Outra forma de acessar ou contatar à variabilidade presente nos 96 acessos avaliados foi realizando o estudo através do análises discriminante, sendo feita a discriminação de populações definidas a *priori* a partir dos dados binários considerando as técnicas baseadas em *k vizinhos mais próximos* e *Distância média*.

A discriminação dos acessos tendo como critério 5 e 2 populações formadas a *priori*, considerando 5 e 2 origens de coleta do material avaliado, é apresentada na Tabela 7 e 8, respectivamente. É claramente evidenciado que a melhor alocação dos acessos foi realizada quando o critério de discriminação foi de 2 populações (2 origens), com percentuais de alocação dos acessos em seus respectivos grupos de mais de 90 % para os classificados a *priori* em Brasil por ambos os métodos de discriminação. Já para os classificados a *priori* em EU. Considerando duas populações, o número de alocações erradas foi maior, com percentuais de alocação correta nos seus respectivos grupos de origem de 54,55 e 68,18 % para os métodos *k vizinhos mais próximos* e *Distância média*, respectivamente.

A taxa de erro aparente (TEA) variou em função do método de discriminação e do critério de classificação a *priori* das populações, sendo obtida a menor TEA (15,12%) pelo método de *Distância média* dos indivíduos em relação a duas populações. As diferenças de valores obtidos no valor da TEA para as populações comparadas foram altas, com valores de 40 e 50 de variação da percentagem de alocação dos acessos pelo método de *k vizinhos mais próximos* e *Distância média*, respectivamente. Esses resultados mostram a ineficiência do método ao discriminar os acessos, de modo geral em base a origem de coleta partindo dos dados moleculares obtidos neste trabalho. A maior parte dos 12 acessos classificados a *posteriori* foram alocados nos grupos representados por as quatro regiões do Brasil ou no mesmo Brasil quando foi considerada 5 e 2 populações, respectivamente.

Tabela 7. Análise discriminante de 5 populações (origem) de *L. esculentum*, baseado na metodologia de *k vizinhos mais próximos* (k=3) e *Distância média*, estimados a partir de 144 locos marcadores ISSR. Os valores destacados em negrito referem-se aos percentuais de alocação dos acessos nos seus respectivos grupos de origem.

Grupo de Origem	Nº de acessos	Percentuais de acessos alocação nos diferentes grupos									
		<i>k vizinhos mais próximos</i>					<i>Distância média</i>				
		SD	CO	S	ND	EU	SD	CO	S	ND	EU
Sudeste (SD)	35	42,86	42,86	2,86	5,71	5,71	5,71	45,71	5,71	28,57	14,29
Centro Oeste (CO)	11	45,45	27,27	0,00	27,27	0,00	9,09	36,36	0,00	54,55	0,00
Sul (S)	2	0,00	50,0	0,00	50,0	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00
Nordeste (ND)	16	6,25	50,0	0,00	43,75	0,00	0,00	31,25	0,00	68,75	0,00
Estados Unidos (EU)	22	13,64	22,73	0,00	9,09	54,55	0,00	22,73	0,00	18,18	59,09
A _p ¹	12	16,64	41,67	0,00	25,00	16,64	0,00	50,00	0,00	33,33	16,64
T _{AA} ²	98	26	37	1	18	16	3	36	2	37	20
TEA (%) ³		56,98					65,12				

¹: Total de acessos alocados a *posteriori*, ²: Total de acessos alocados em cada população, ³: Taxa de erro aparente.

Tabela 8 Análise discriminante de 2 populações (origem) de *L. esculentum*, baseado na metodologia de *k vizinhos mais próximos* (k=3) e *Distância média*, estimados a partir de 144 locos marcadores ISSR. Os valores destacados em negrito referem-se aos percentuais de alocação dos acessos nos seus respectivos grupos de origem

Grupo de Origem	Nº de acessos	Percentuais de acessos alocação nos diferentes grupos			
		<i>k vizinhos mais próximos</i>		<i>Distância média</i>	
		Brasil	EU	Brasil	EU
Brasil	64	92,19	7,81	90,63	9,38
EU	22	45,45	54,55	31,82	68,18
A _p ¹	12	83,33	16,67	75,00	25,00
T _{AA} ²	98	79	19	74	24
TEA (%) ³		17,44		15,12	

¹: Total de acessos alocados a *posteriori*, ²: Total de acessos alocados em cada população, ³: Taxa de erro aparente.

DISCUSSÃO

Marcadores moleculares ISSR tem sido utilizados com sucesso na caracterização de germoplasma do gênero *Lycopersicon* (Tikunov *et al.*, 2003; Kocheiva *et al.*, 2002b) especialmente na diferenciação de acessos de diferentes espécies.

No presente estudo, os marcadores ISSR também foram úteis na caracterização de acessos de *Lycopersicon esculentum*, amplificando número relativamente elevado de locos por *primer*, com bandas bem definidas e de elevada reprodutibilidade. Entretanto, o nível de polimorfismo detectado foi baixo, se comparado com o obtido por outros artigos envolvendo esta classe de marcadores em outras espécies (Han *et al.*, 2007; Liu & Wang, 2006; Martins-Lopes *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2006). Por outro lado, o grau de divergência genética detectada entre acessos de *L. esculentum*, mediante o uso destes marcadores moleculares, foi considerado alto quando comparado com nível de polimorfismo entre acessos de outras espécies do gênero (Kochieva *et al.*, 2002b), entretanto a variabilidade encontrada foi suficiente para diferenciar a maioria dos acessos caracterizados em nosso trabalho,

Esse baixo polimorfismo pode ser também comparado com o obtido por Park *et al.* (2004) que avaliaram a diversidade genética de 74 cultivares de *L. esculentum* através de AFLP, e obtiveram 9,3 % de bandas polimórficas do total de bandas obtidas. Kochieva *et al.* (2002a) ao estimar o polimorfismo genético de espécies do gênero *Lycopersicon* empregando RAPD, o análise revelou que o polimorfismo inter-específico dos representantes do gênero é de 98,8% e o polimorfismo intra-específico dos cultivares de *L. esculentum* foi menor com apenas 65,6%, sendo as diferenças entre populações e cultivares menores que entre espécies. Todos estes trabalhos mostram o baixo polimorfismo acessado por diferentes marcadores moleculares, quando se comparam acessos ou indivíduos da mesma espécie *Lycopersicon*.

Dentre os 10 marcadores ISSR empregados, os que tinham o motivo (GA)₇ e (GA)₈ foram os que produziram o maior número de bandas amplificadas e bandas polimórficas, com 78 de 144 e 31 de 53, respectivamente, manifestando a presença

dessa combinação de nucleotídeos no genoma da cultura de tomateiro. Smulder *et al.* (1997) identificaram em genótipos de *Lycopersicon* 80 locos polimórficos de microsatelites contendo sucessões de um a cinco nucleotídeos, sendo o motivo (AT)_n o mais comum, presente em 33 dos 80 locos identificados. Entre tanto, *primers* ISSR foram utilizados para estudar cinco espécies do gênero (*L. esculentum*, *L. pennellii*, *L. cheesmanii*, *L. humboldtii* e *L. hirsutum*), gerando numerosas bandas polimórficas, sendo os *primers* com motivos (AC)_n, (CA)_n, (GA)_n e (AG)_n os que manifestaram o maior número de bandas polimórficas (Tikunov *et al.*, 2003). Esses resultados coincidem com os obtidos em nosso trabalho, mostrando o elevado polimorfismo da repetição GA, ainda que menos comum em representantes da espécie *Lycopersicon esculentum*, se comparado com o resto das combinações presentes neles.

A variabilidade dos acessos avaliados pertencentes à espécie *L. esculentum* pôde ser classificada como elevada, pois muitas diferenças genéticas entre eles foram obtidas, sendo evidenciadas por o elevado número de grupos formados por os métodos de agrupamento de otimização de Tocher e a diferenciação da maioria dos acessos pelo método hierárquico UPGMA. Como se está trabalhando com acessos de uma mesma espécie, os resultados estão refletindo o nível de divergência genética entre eles e a importância de serem conservados no BGH da UFV, a fim de manter esta elevada variabilidade muito importante para os programas de melhoramento. Já outros autores (Tikunov *et al.*, 2003; Kocheiva *et al.*, 2002b), ao trabalhar nessa mesma espécie encontraram poucas diferenças entre representantes da espécie *Lycopersicon esculentum*.

Santos (2004) avaliando a diversidade genética detectada através de marcadores RAPD e AFLP em 41 acessos (dentre estes, apenas 3 não foram incluídos dentre os 96 avaliados) da coleção do BGH da UFV, obtive 35 % e 0 % de bandas polimórficas, respectivamente, manifestando o baixo polimorfismo detectado por ambos os métodos, próximo do obtido em nosso trabalho que foi de 36 % por ISSR, se comparado com o detectado pelo autor ao empregar marcadores RAPD. Esse mesmo autor não obteve nenhuma relação entre a origem dos acessos e os agrupamentos obtidos, sendo de igual modo em nosso trabalho. Estes resultados podem ser interpretados como evidência da pouca importância do local de origem, ou seja, das características mesológicas onde ocorreu a seleção natural e no caso do tomateiro, também a seleção consciente praticada pelo homem no sentido de aumentar a adaptação do vegetal aos seus gostos e costumes no desenvolvimento de

landraces de tomateiro.

Os resultados obtidos pelas análises discriminantes, ao considerar diferentes origens como diferentes populações, mostraram que os locos de marcadores ISSR foram adequados para diferenciar os acessos em duas populações, mais inadequados para 5 populações ao considerar a TEA. Os resultados mostraram também que o resultado do análises discriminante é dependente do método de discriminação (*k vizinhos mais próximos* ou *Distância média*), assim como também, do número de populações consideradas para um mesmo grupo de acessos ou de indivíduos.

Quanto às populações, os resultados acusam que existe certa diferenciação clara entre os acessos coletados no Brasil e nos EU, porém, sem um padrão de classificação certo na maioria dos acessos ao serem alocados só 63:73 (*k vizinhos mais próximos* : *Distância média*) e 37:30 acessos de forma correta por ambos métodos dos 98 acessos avaliados, considerando 2 e 5 populações, respectivamente.

Pelo presente estudo evidenciou-se que os marcadores ISSR foram eficientes na estimação da diversidade genética dos acessos de *Lycopersicon* caracterizados, com diferentes níveis de polimorfismo. A informação identificada pelos *primers* empregados neste estudo permitiu caracterizar e agrupar o germoplasma, permitindo diferenciar em grupos aos acessos. Esta mesma estratégia de caracterização empregando *primers* ISSR contribuirá no futuro na caracterização completa dos mais de 800 acessos presentes na coleção do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Viçosa, pela realização desse trabalho. Ao CNPq, pela concessão de bolsa de pesquisa ao primeiro autor do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Belaïd, Y., Chtourou-GhorbeL. N., Marrakchi, M. & Trifi-Farah, N. Genetic diversity within and between populations of *Lathyrus* genus (Fabaceae) revealed by ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 53:1413-1418. 2006.

- Cruz, C. Programa GENES: Análises multivariada e simulação. Viçosa: 250p. 2006.
- Cruz, C.D. & Carneiro, P.C.S. Diversidade genética. In: UFV, E. (Ed.) Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: pp.357-434 2003.
- D'Arcy, W.G. Solanaceae studies. pp.3-47 In: The Biology and taxonomy of the Solanaceae. London: Academic Press. 1979.
- Doyle, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15. 1990.
- Fraleigh, B. Global overview of crop genetic resources. pp.21-31 In: RUANE, J. & SONNINO, A. (Eds.) The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. Roma, Italia: Divisão de Informação da FAO. 2006.
- Goulão, L. & Oliveira, C. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica 122:81-89. 2001.
- Han, Y., Teng, C., Zhong, S., Zhou, M., Hu, Z. & Song, Y. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in central China detected by ISSR markers. Aquatic Botany 86:69-75. 2007.
- Hodkinson, T., Chase, M. & Renvoize, S. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. Annals of Botany 89:627-636. 2002.
- Karp, A. 4. The New Genetic Era: Will it Help us in. pp.43-56 In: IPIGRI (Ed.) Managing Plant Genetic Diversity. 2002.
- Kochieva, E.Z., Ryzhova, N.N., Khrapalova, I.A. & Pukhal'skiä, V.A. Using RAPD for estimating genetic polymorphism in and phylogenetic relationships among species of the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. Genetika 38:2002a.
- Kochieva, E.Z., Ryzhova, N.N., Khrapalova, I.A. & Pukhalskiy, V.A. Genetic diversity and phylogenetic relationships in genus *Lycopersicon* (Torn) Mill. as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. Russian Journal of Genetics 38:958-966. 2002b.
- Liu, A. & Wang, J. Genomic evolution of Brassica allopolyploids revealed by ISSR marker. Genetic Resources and Crop Evolution 53:603-611. 2006.
- Manimekalai, R. & Nagarajan, P. Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. Scientia

Horticulturae 108:49-54. 2006.

Marim, B., & Silva, D. J. (2005). *UFV*. Acesso em 5 de Julio de 2007, disponível em Banco de Germoplasma de Hortaliças: <http://www.ufv.br/bgh/files/pag/tomate.htm>

Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P. & Dinelli, G. Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:175–188. 2007.

Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Gomes, S., Meirinhos, J., Santos, L. & Guedes-Pinto, H. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:117-128. 2007.

Masumbuko, L. & Bryngelsson, T. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of diploid coffee species and cultivated *Coffea arabica* L. from Tanzania. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:357-366. 2006.

Nagaoka, T. & Ogihara, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 94:597-602. 1997.

Osipova, E., Koveza, O., Troitskij, A., Dolgikh, Y.I., Shamina, Z. & Gostimskij, S. Analysis of Specific RAPD and ISSR Fragments in maize (*Zea mays* L.) somaclones and development of SCAR markers on their basis. *Russian Journal of Genetics* 39:1412-1419. 2003.

Park, Y.H., West, M.A.L. & Clair, D.A.S. Evaluation of AFLPs for germplasm fingerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Genome* 47:510–518. 2004.

Prevost, A. & Wilkinson, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet* 98:107-112. 1999.

Reddy, M., Sarla, N. & Siddiq, E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17. 2002.

Saini, N., Jain, N., Jain, S. & Jain, R. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. *Euphytica* 140:133-146. 2004.

- Santos, S.G. Diversidade genética de acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa com base em dados morfológicos e moleculares. Mestrado, Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2004.
- Shen, J., Ding, X., Liu, D., Ding, G., He, J., Li, X., Tang, F. & Chu, B. Inter simple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et MIGO. Biol. Pharm. Bull. 29:420-422. 2006.
- Silva, D.J., Moura, M.C. & Casali, V.W. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta. Horticultura Brasileira 19:108-114. 2001.
- Smulders, M.J.M., Bredemeijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P. & Vosman, B. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. Theor Appl Genet 97:264–272. 1997.
- Souframanien, J. & Gopalakrishna, T. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. Theor Appl Genet, 109:1687-1693. 2004.
- Tanyolac, B. Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) populations from west Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution 50:611-614. 2003.
- Taylor, I.B. Biosystematic of the tomato. pp.1-34. In: ATHERTON, J.G. & RUDICH, J. (Eds.) The tomato crop: a scientific basis for improvement. London: 1986.
- Tikunov, Y.M., Khrustaleva, L.I. & Karlov, G. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. Euphytica 131:71-80. 2003.