



# **XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**

## **Instituto Agronômico - Campinas, SP**

### **7 a 9 de Fevereiro de 2017**

#### **DIAGNOSE RÁPIDA POR PCR DO GENE DE RESISTÊNCIA AO ZYMV EM ABOBRINHA**

Haiko Enok Sawazaki<sup>1</sup>, Valdir Atsushi Yuki<sup>2</sup>, Marlon Ricardo Alvez Ortiz<sup>3</sup>, Walter Hissao Banja<sup>3</sup>, Julio Massaharu Marubayashi<sup>3</sup>, Geovanne Amorim Luchini<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Agronômico, APTA, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas-SP. [henok@iac.sp.gov.br](mailto:henok@iac.sp.gov.br) <sup>2</sup>Instituto Agronômico, APTA, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Campinas-SP. <sup>3</sup>Hortec Tecnologia de Sementes, Bragança Paulista, SP. [marlon.ortiz@hortec.com.br](mailto:marlon.ortiz@hortec.com.br) <sup>4</sup>Bolsista PIBITI/CNPq.

**RESUMO – Uma das principais viroses em abobrinha é causado pelo Potyvirus *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Apesar dos vários genes de resistência reportados para o ZYMV, marcador de resistência consistente não foi ainda disponibilizado para abobrinha. O objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de marcador molecular para o gene de resistência ao ZYMV em abobrinha, para facilitar a diferenciação do resistente e suscetível com uma simples reação de PCR. Foram testados cultivar suscetível e híbrido resistente e realizadas análises em 110 linhagens e híbridos. Os marcadores específicos foram desenvolvidos baseados em homologia com genes análogos ou homólogos através da comparação das sequências de marcadores não específicos ou de outras espécies com sequências em abóboras. Dos 38 primers testados, os baseados em marcador RAPD reportado próximo ao gene de resistência ao ZYMV forneceram os primers 36R/826R que amplificaram o fragmento de 791pb que diferenciaram consistentemente o híbrido resistente Px7051 e a cultivar suscetível La Belle. A concordância dos resultados da análise de PCR em 110 plantas de abobrinha foi de 99% em relação aos resultados dos testes biológicos de inoculação mecânica do ZYMV nessas linhagens.**

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

#### **INTRODUÇÃO**

O cultivo de híbridos ou cultivares resistentes representa o melhor método de controle de doenças. A triagem para a obtenção de fontes de resistência baseada em sintomas requer tempo, depende do clima e possibilita disseminar o vírus, sendo importante marcador polimórfico de resistência que evita esses problemas para facilitar este processo. Atualmente, uma das principais doenças em abobrinha caserta ou italiana (*Cucurbita pepo* L.) é causada pelo Potyvirus, *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), vulgarmente conhecido como vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de-moita.



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

**7 a 9 de Fevereiro de 2017**

Vários genes relacionados a resistência ao ZYMV já foram reportados em *Cucurbita moschata* L., *Zym-0*, *Zym-4*, *Zym-1*, *Zym-2*, *Zym-3*, *zym<sup>mos</sup>*, *zym -4*, *zym -5*, *zym -6* (PARIS & BROWN, 2005, PACHNER et al, 2011).

Marcadores moleculares consistentes já foram disponibilizados para o gene de resistência ao ZYMV em melancia (HARRIS et al. 2009). Em melão, o microssatélite CMAG36 foi relatado estar ligado ao alelo dominante *Zym-1* e o microssatélite CMBR55 provavelmente ao alelo dominante *Zym-2* (WASSANO, DT, 2013). Em pepino AMANO et al. (2013) mapearam e relataram marcadores CAPS ao gene recessivo *zym* (*zym A192-18*), tendo correlacionado sua resistência ao ZYMV com o gene VPS-4 like protein (tipo RGA) .

Para abobrinha e abóbora foram relatados marcadores do tipo CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) que necessita de restrição por APUOZZO et al. (2013), enquanto o tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) que não necessita de restrição para diferenciação entre os parentais suscetível e resistente, por CHEN (2014) sem detalhar o marcador, ZRAIDI, et al. (2007) citando marcador com diferença de apenas seis bases (o que dificulta a identificação) e HUANG et al. (2014), mencionando marcadores próximos ao gene de resistência ao ZYMV, cujos resultados de inoculação e retrocruzamento, porém, não foram concordantes. PACHNER, et al. (2015) identificaram dois marcadores SSR, respectivamente para os genes *Zym-1* e *Zym-0*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas folhas jovens do híbrido resistente Px7051 da Seminis e da cultivar suscetível La Belle da Hortec Sementes, além de cento e dez acessos (linhagens e híbridos) de abobrinha para caracterização da presença do gene *Zym* ligado a resistência para ZYMV. A extração de DNA foi feita utilizando CTAB modificado de acordo com a metodologia do laboratório (SAWAZAKI et al., 2013).

Para ZYMV foram testados 38 primers desenvolvidos das sequências homólogas de *C. moschata* com RGAs de melancia, ou RGAs e Unigenes de *C. pepo* em diversas combinações e da sequência de vários marcadores relatados próximos ao gene de resistência:

1. Da região do marcador WRGA7 de HARRIS et al.(2009) que mostrou 86% identidade dos aminoácidos com a proteína NBS de resistência da *C. moschata* (ABM89098), do BLAST das



# **XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**

## **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

**7 a 9 de Fevereiro de 2017**

sequências de melancia de GU124550 a GU124555 foram encontradas as sequencias homólogas de *C. moschata* com 501 a 519pb: Genbank EF101660, EF101661, EF101662, EF101663, EF101664, EF101665, EF199755, EF199756, EF199757, EF199758, as quais foram alinhadas pelo BioEdit para procura das regiões homólogas e desenvolvidos os primers 45WRGA7/347WRGA7, 19ZYM/440ZYM, 322ZYMAb/720ZYMAb, 300ZYMAb/615ZYMAb, 282ZYMAb/700ZYMAb, 322ZYMAb/615ZYMAb.

2. Dos primers degenerados para RGAs para *C. pepo* de acordo com Lin et al. (2013), 16410RGA/310RGA ou das sequências dos RGAS homólogas para *C. pepo*, RGA7(1, 3, 4, 5, 6, 10), RGA4(5, 7), RGA14(3, 9, 11), respectivamente Genbank KC107093, KC107203, KC107094, KC107204, KC107205, KC107202, KC107090, KC107091, KC107079, KCRGA14 e KC107077 os primers 20RGA/ 372RGA, 16410RGA/310RGA, 4pepo/497pepo, 4Mpepo/506pepo, 8pepo/400pepo, Mpepo/500pepo.

3. Do unigene CUTC002671 referente a família *eIF4E* no genoma de *C. pepo* de BLANCA et al. (2011) para resistência a Potyvirus, os primers: 95CUT:/547CUT, 152CUT/ 663CUT, 150CUT/574CUT, 200CUT/559CUT.

4. Testes com marcadores de literatura próximos do gene de resistência ao ZYMV como o RAPD UBC522 (TCGTCTAGCA) e UBC083 (UBC083) de HUANG et al. (2014) em abóbora cujo sequenciamento dos fragmentos resistentes e suscetíveis originaram os primers 21R/494R, 132R/696R, 36R/826R, 30R/1003R, 23S/529S, 1S/536S.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 38 primers testados para ZYMV, o marcador baseado no RAPD UBC522 forneceu os primers 36R/826R, que amplificaram o fragmento de 791pb e diferenciaram consistentemente o híbrido resistente Px7051 do cultivar suscetível La Belle como é apresentado na Figura 1 onde três concentrações não apresentaram diferenças. A reação de PCR foi feita com volume de 15 µl, com 20-40ng de DNA, primers para concentração final de 1 µM cada, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X tampão PCR, 0,2mM dNTP e 1,0 a 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Ludwig ou Sinapse) com as condições de uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos seguido por 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 40s, anelamento a 52°C por 40s e extensão a 72°C, por 50s finalizando



# XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

## Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

com uma etapa de extensão de 5 min a 72°C. Os resultados da análise realizada com 110 amostras de abobrinha (Figura 2) da Hortec Sementes Ltda foram confirmados com os obtidos por inoculação mecânica do ZYMV.

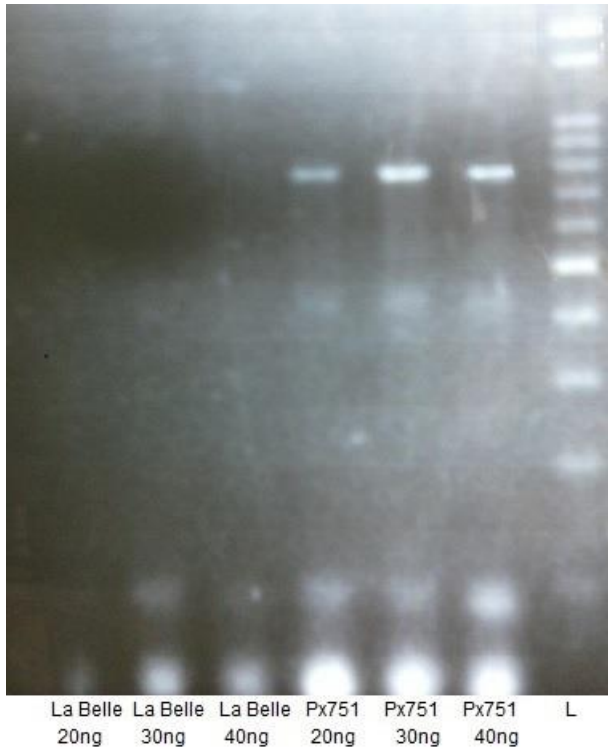


Figura 1. Perfil de amplificação com os primers 36R/826R para as amostras de abobrinha La Belle (suscetível) e o híbrido Px7051 (resistente) com três concentrações de DNA.

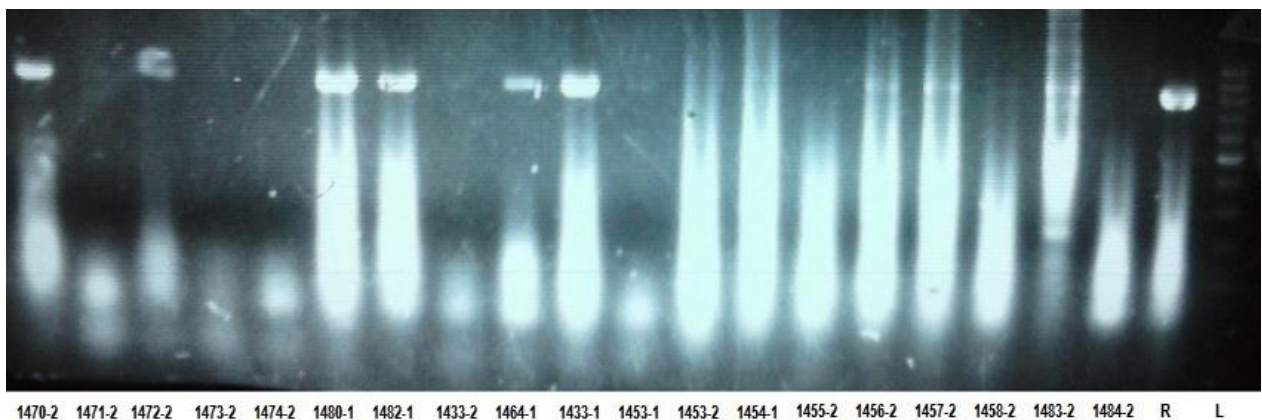


Figura 2. Perfil de amplificação de amostras de abobrinha com os primers 36R/826R.



# XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

## Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

### CONCLUSÃO

A ocorrência de polimorfismo utilizando os primers 36R/826R com a presença do fragmento amplificado de 791pb somente para amostra resistente ao ZYMV, comprovou o desenvolvimento de marcadores para diferenciação entre plantas com ou sem o gene de resistência ao ZYMV, possibilitando a distinção entre suscetível e resistente com uma simples reação de PCR, o que facilitará a triagem para o processo de obtenção de plantas resistentes ao ZYMV em abobrinha.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANO, M., MOCHIZUKI, A., KAWAGOE Y., IWAHORI K., NIWA K., SVOBODA J., MAEDA T., IMURA Y. High-resolution mapping of *zym*, a recessive gene for *Zucchini yellow mosaic virus* resistance in cucumber. *Theor. Appl. Genet.* V.126, n.12, p.2983-93, 2013.
- APUOZZO, C.; MANZO, D.; FORMISANO, G.; ERCOLANO, M.R. Caps and hmr markers for rapid detection of ZYMV resistance loci in zucchini, Proceedings of the 57th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Foggia, Italy – 16/19 September, 2013.
- BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; ROIG, C.; ZIARSOLO, P.; NUEZ, F.; PICÓ, B. Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *BMC Genomics* v.12, p.104, 2011.
- CHEN, SZ-YUN. Developing the Molecular Markers for *Zucchini yellow mosaic virus* Resistance in Winter Squash (*Cucurbita moschata*). International Plant & Animal Genome Conference XXII. January 13, San Diego, CA, 2014.
- HARRIS, K.R.; LING, K.; WECHTER, W.P.; LEVI, A. 2009. Identification and utility of markers linked to the *Zucchini yellow mosaic virus* resistance gene in watermelon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* v.134, p.1-6, 2009.
- LIN, X.; ZHANG, Y.; KUANG, H.; CHEN, J. Frequent loss of lineages and deficient duplications accounted for low copy number of disease resistance genes in Cucurbitaceae. *BMC Genomics* v.14, p.335, 2013.
- HUANG, C-C; OU, S-L; LIN, C-Z; CHEN, S-Z; CHOU, J-C; KU, H-M. Simulation study of genomic markers for *Zucchini yellow mosaic virus*. Resistance in Winter Squash (*Cucurbita moschata*). *Crop Environment and Bioinformatics* 11: 26-38, 2014.
- PACHNER, M.; PARIS, H.S.; LELLEY, T. Genes for resistance to *Zucchini yellow mosaic* in tropical pumpkin. *J. Hered.* V.102, n.3, p.:330-5, 2011.



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

PACHNER, M.; PARIS, H.S., WINKLER, J.; LELLEY, T. Phenotypic and marker-assisted pyramiding of genes for resistance to zucchini yellow mosaic virus in oilseed pumpkin (*Cucurbita pepo*). *Plant breeding*, v.134, n.910, p.121-128, 2015.

PARIS, H.S.; BROWN, R.N. The genes of pumpkin and squash. *HortScience* v.40, p.1620-1630, 2005.

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

WASSANO, D.T. 2013. Identificação de marcadores ligados a genes de resistência à multiplicação de *Zucchini yellow mosaic potyvirus* (ZYMV) em meloeiro. Tese de Mestrado. Piracicaba, 2013. 74p.

ZRAIDI, A.; STIFT, G.; PACHNER, M.; SHOJAEIYAN, A.; GONG L.; LELLEY, T.A. Consensus map for *Cucurbita pepo*. *Mol. Breeding*, 20:375–388, 2007.