

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Fitopatologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA AMPLA  
E DURÁVEL EM *SOLANUM* (SECÇÃO *LYCOPERSICON*) A *POTYVIRUS* E  
*TOSPOVIRUS***

**Doutorando: Érico de Campos Dianese**  
**Orientador: Renato de Oliveira Resende**  
**Co-orientador: Leonardo Silva Boiteux**

**Brasília, 2009**

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Fitopatologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**ESTRATÉGIAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA AMPLA  
E DURÁVEL EM *SOLANUM* (SECÇÃO *LYCOPERSICON*) A *POTYVIRUS* E  
*TOSPOVIRUS***

**Doutorando: Érico de Campos Dianese**  
**Orientador: Renato de Oliveira Resende**  
**Co-orientador: Leonardo Silva Boiteux**

**Tese apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em  
Fitopatologia, do Departamento  
de Fitopatologia da Universidade  
de Brasília, como requisito para  
a obtenção do grau de Doutor  
em Fitopatologia.**

**Brasília, 2009**

Trabalho realizado junto ao programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Professor Dr. Renato de Oliveira Resende e apoio institucional e financeiro da CAPES e CNPq.

**Aprovado por:**



**Renato de Oliveira Resende (orientador)**

Professor - Departamento de Fitopatologia e Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília



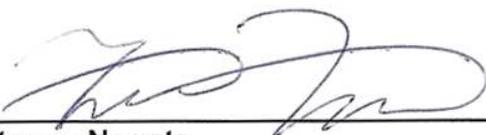
**Antônio Carlos de Ávila**

Pesquisador - Embrapa Hortaliças (CNPq)



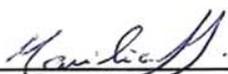
**Francisco José Lima Aragão**

Pesquisador - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)



**Tatsuya Nagata**

Professor - Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília



**Marília Santos Silva**

Pesquisadora - Embrapa Cerrados (CPAC)

À minha esposa e companheira de  
aventuras Emanuela,

A meus pais José Carmine e  
Heloísa,

A meus irmãos Christiény e Alexei,

Dedico

*"... all we have to decide is what to do with the time that is given to us."*

*- Gandalf, the Grey*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, especialmente ao Departamento de Fitopatologia por todo o aprendizado e por esse caminho que só pode ser trilhado graças a formação acadêmica.

Ao prof. Renato Resende, meu orientador, pela amizade, pela grande oportunidade oferecida, pelo apoio, estando sempre acessível mesmo quando quase sem tempo, pela orientação e pela companhia sempre agradável.

Aos professores pesquisadores Alice Nagata, Leonardo Boiteux, Esther Fonseca, Rob Goldbach (*in memoriam*) e Richard Kormelink pela inspiração e idéias que sempre fluem com extrema facilidade, pelo exemplo de paixão pela pesquisa, paciência e disposição infinitas para auxiliar no desenvolvimento deste trabalho, pela oportunidade profissional e de vida a mim oferecida, pelo apoio e orientação.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia: Adalberto Café Filho, Carlos Antonio Inácio, Carlos Hidemi Uesugui, Cláudio Lúcio Costa, Denise Vilela Rezende Santiago, José Carmine Dianese, Juvenil Enrique Cares, Luiz Eduardo Bassay Blum, Mariza Álvares Ferreira, Mariza Sanchez e Renato de Oliveira Resende. Pelos ensinamentos e acompanhamento durante essa longa caminhada.

Em especial a professora Cláudia Renata Martins (*in memoriam*), sem seu apoio e sua paciência durante a orientação de meu mestrado eu não teria tomado gosto pelo que atualmente faço. Sua sabedoria e beleza agora iluminam os céus.

Aos pesquisadores da Embrapa Hortaliças (CNPq) com quem interagi nesses quatro anos de desenvolvimento desta tese, em especial aos Drs. Antônio Carlos de Ávila e André Dusi que permitiram o uso do espaço e dos equipamentos do Laboratório de Virologia, bem como de algumas das casas de vegetação do CNPH. Pelas dicas, apoio e disposição para o esclarecimento de dúvidas.

Aos membros da banca examinadora, Antônio Carlos de Ávila, Francisco José Lima Aragão, Tatsuya Nagata e Marília Santos Silva, por terem concordado em participar da avaliação deste trabalho.

Aos secretários do programa da Pós-Graduação em Fitopatologia, Ribamar e Silene; e do Laboratory of Virology, Thea van Bommel, sempre dispostos a ajudar nos inúmeros problemas que surgem na vida de um estudante e pela prosa eventual.

Aos amigos(as) do doutorado, em especial à Ângela Sathiko e Rita de Cássia Pereira, que sempre me ajudaram a manter o espírito elevado e a seguir sempre em frente dividindo nossas dificuldades, agruras e sucessos.

Aos amigos(as) do Laboratório de Biologia Molecular e de Virologia da Embrapa Hortaliças, Leo Albuquerque, Mariana Martins, Mariana Hallwass, Pedro Paulo, Edmércia, Paulo, Carol, Thaís, Bruna, Sarah, Patrícia pela amizade constante, dicas, sugestões, conversas e tudo o mais que um ambiente de profissionalismo e companheirismo auxilia a construir.

De igual forma aos técnicos de laboratório Francisco (Chico Bucha), William e aos amigos Lúcio, Oneilson e Dick Lohuis pela presteza em auxiliarme, ou simplesmente pela excelente companhia.

Ao pessoal do galpão de apoio e da parte de campo do CNPH, em especial ao seu Hamilton, Pedro, Galego e a todos que auxiliam no estabelecimento e manutenção dos nossos experimentos. Sem vocês o nosso trabalho seria impossível.

Aos pesquisadores do Laboratório de Virologia da Universidade de Wageningen em especial a Dick Peters e Jan Van Lent pela receptividade.

Aos amigos do mesmo laboratório, em especial a Esther, Christina, Afshin, Rick, Teye, Corinne, Dowty, Thomas e a todos os estudantes do laboratório de baculovírus, pela capacidade de fazer com que eu me sentisse em casa mesmo estando tão longe. Sua amizade foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Conto com um novo encontro ao longo de nossas vidas.

Ao André Bertran, pelo grande auxílio, principalmente em alguns ELISAs e pela amizade e simpatia.

Aos brasileiros em Wageningen, em especial ao Daniel Kinpara, que através de sua amizade e receptividade me ajudaram muito a não me sentir sozinho mesmo tão longe de meus amigos e familiares.

Ao grupo da estação de La-Mayora, Espanha, pelo fornecimento de materiais importantíssimos para a conclusão deste trabalho, em especial a Enrique Moriones.

Aos meus amigos que, novamente sem entender nada do que diabos eu estava fazendo, sempre compreenderam minhas ausências e sumiços, me recebendo novamente de braços abertos ajudando-me imensamente.

À minha família que sempre me apoiou e me ajudou a continuar em frente, seguindo os caminhos tortuosos da ciência.

A Deus, pela presença constante em minha vida.

# ÍNDICE

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUÇÃO GERAL .....	5
<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
CARACTERÍSTICAS DA CULTURA .....	10
TOSPOVIRUS .....	13
Resistência mediada pelo gene Sw-5 em tomate.....	19
Teoria gene-a-gene na interação patógeno/hospedeiro.....	22
PEPPER YELLOW MOSAIC VIRUS .....	25
Resistência recessiva envolvida na interação potyvírus/hospedeira.....	30
OBJETIVOS.....	33
<b>CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AO PEPPER YELLOW MOSAIC VIRUS E AO POTATO VIRUS Y EM ACESSOS DE ESPÉCIES SELVAGENS DE SOLANUM (SECÇÃO LYCOPERSICOM).....</b>	<b>34</b>
1) INTRODUÇÃO.....	35
2) MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
2.1) Obtenção do isolado.....	37
2.2) Seleção de genótipos resistentes.....	37
2.2.1) Preparo das mudas .....	37
2.2.2) Manutenção e preparo do inóculo.....	38
2.2.3) Inoculação .....	38
2.2.4) Purificação do vírus e preparo de anticorpos (IgG).....	39
2.2.4) Avaliação da resistência.....	41
3) RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1) Obtenção do isolado.....	41
3.2) Avaliação da resistência.....	44
3.3) Análise do espectro de resistência.....	48
<b>CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA EM GERMOPLASMA DE SOLANUM (SECÇÃO LYCOPERSICOM) AO COMPLEXO DE ESPÉCIES NEOTROPICAIS DE TOSPOVIRUS.....</b>	<b>51</b>
1) INTRODUÇÃO.....	52
2) MATERIAIS E MÉTODOS .....	57
2.2) Seleção de genótipos resistentes.....	57
2.2.1) Preparo das mudas .....	57
2.2.2) Isolados virais e preparo do inóculo.....	57
2.2.3) Inoculação dos genótipos .....	58
2.2.4) Avaliação da reação de acessos de Solanum (secção Lycopersicon) a isolados de TCSV, GRSV, CSNV e TSWV.....	58
3) RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
3.1) Seleção de acessos resistentes.....	59
<b>CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO DE UM MARCADOR CO-DOMINANTE PARA O GENE SW-5 (RESISTÊNCIA A TOSPOVIRUS) PARA SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES A PARTIR DE UMA AMPLA GAMA DE ACESSOS DE TOMATE .....</b>	<b>68</b>
1) INTRODUÇÃO.....	69

2) MATERIAIS E MÉTODOS .....	72
2.1) Desenho dos primers e sua localização dentro do locus Sw-5.....	72
2.2) Extração de DNA, ciclos de PCR e análise do gel de agarose.....	73
2.3) Ensaios em casa de vegetação utilizando-se de linhagens quase-isogênicas para avaliar a associação entre o perfil de PCR e a resistência a Tospovirus.....	73
2.4) Ensaios em campo com linhagens quase-isogênicas para avaliar a associação entre o amplicon 'Sw-5-2' e resistência a tospovirus.....	74
2.5) Análise da seqüência completa dos amplicons obtidos com o par de primers 'Sw-5-2' de duas linhagens quase-isogênicas .....	74
2.6) Sequenciamento direto dos amplicons 'Sw-5-2' de 14 acessos de tomate.....	75
3) RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
<b>CAPÍTULO 5 - ANÁLISE DE CINCO GENES DE TOMATO SPOTTED WILT VIRUS COMO POTENCIAIS FATORES DE AVIRULÊNCIA, USANDO COMO MODELO BIOLÓGICO NICOTIANA BENTHAMIANA TRANSGÊNICA EXPRESSANDO UMA CÓPIA FUNCIONAL DO GENE SW-5 DO TOMATEIRO .....</b>	<b>84</b>
1) INTRODUÇÃO.....	85
2) MATERIAIS E MÉTODOS .....	88
2.1) Construção de vetores para expressão transiente.....	88
2.2) Utilização da plataforma transgênica de <i>N. benthamiana</i> para ensaios de expressão transiente e efeito de proteínas virais .....	91
2.3) Expressão transiente de construções contendo individualmente os genes <i>N</i> , <i>Nss</i> , <i>Nsm</i> , <i>Gn</i> e <i>Gc</i> de TSWV mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	92
2.4) Análise da expressão transiente.....	93
3) RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	95
3.1) Utilização da plataforma transgênica de <i>N. benthamiana</i> para ensaios de expressão transiente e efeito de proteínas virais .....	95
3.2) Expressão transiente de construções contendo individualmente os genes <i>N</i> , <i>Nss</i> , <i>Nsm</i> , <i>Gn</i> e <i>Gc</i> de TSWV mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	97
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107
ANEXOS.....	122

# ÍNDICE DE TABELAS

## CAPÍTULO 1

<b>TABELA 1.</b> LISTAGEM DE ESPÉCIES DE TOMATE E EQUIVALENTES NO PREVIAMENTE RECONHECIDO GÊNERO <i>LYCOPERSICON</i> E O MODO DE REPRODUÇÃO DE CADA ESPÉCIE (MODIFICADO DE PERALTA <i>ET AL.</i> , 2006). ..	<b>12</b>
<b>TABELA 2.</b> ESPÉCIES DE <i>TOSPOVIRUS</i> , ESPÉCIES DE TRIPES VETORES E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS MESMOS (MODIFICADA DE MEHRABAN, 2008).....	<b>14</b>
<b>TABELA 3.</b> CLASSES DE GENES R CARACTERIZADOS EM VÁRIAS ESPÉCIES VEGETAIS CONTENDO ESTRUTURAS CONSERVADAS ENTRE ELES (ADAPTADA DE HULBERT <i>ET AL.</i> , 2001).....	<b>20</b>
<b>TABELA 4.</b> GENES RECESSIVOS DE RESISTÊNCIA A VÍRUS VEGETAIS ENCONTRADOS EM ACESSOS DE PLANTAS CULTIVADAS E SELVAGENS (MODIFICADO DE MAULE <i>ET AL.</i> , 2007). .....	<b>31</b>

## CAPÍTULO 2

<b>TABELA 1.</b> RELAÇÃO DE AMOSTRAS COLETADAS EM TAQUARA, DF, E RESULTADOS DE ELISA PARA POTYVÍRUS, TOSPOVÍRUS E CUCUMOVÍRUS E PCR PARA BEGOMOVÍRUS. OS RESULTADOS DE LEITURA PARA ELISA (EM VERMELHO) FORAM CONSIDERADOS POSITIVOS PARA PEPYMV (VALOR DUAS VEZES MAIOR QUE O OBTIDO PELO CONTROLE NEGATIVO). O ISOLADO SELECIONADO PARA O USO NOS TESTES DE RESISTÊNCIA ESTÁ EM AZUL.....	<b>42</b>
<b>TABELA 2.</b> ACESSOS TESTADOS PARA RESISTÊNCIA A PEPYMV. OS ACESSOS EM VERMELHO APRESENTARAM RESISTÊNCIA, SEM EXPRESSÃO DE SINTOMAS E RESULTADO NEGATIVO EM ELISA PARA TODAS AS PLANTAS. ....	<b>45</b>
<b>TABELA 3.</b> ACESSOS DE TOMATE INOCULADOS COM PVY PARA AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE RESISTÊNCIA A POTYVÍRUS. TODOS OS ACESSOS DE <i>S. HABROCHAITES</i> TESTADOS ANTERIORMENTE FORAM ADICIONADOS NESSE TESTE DEVIDO A POSSIBILIDADE DE APRESENTAREM RESISTÊNCIA A PVY. OS ACESSOS EM VERMELHO FORAM OS QUAIS APRESENTARAM RESULTADO NEGATIVO EM ELISA PARA TODAS AS PLANTAS TESTADAS. .	<b>50</b>

## CAPÍTULO 3

<b>TABELA 1.</b> REAÇÃO DE ACESSOS DE <i>SOLANUM</i> (SECÇÃO <i>LYCOPERSICON</i> ) COM UM ISOLADO DE <i>GROUNDNUT RINGSPOT VIRUS</i> (GRSV) VIA INOCULAÇÃO MECÂNICA. UM SUBGRUPO DE ACESSOS (RESISTENTES E SUSCETÍVEIS) FOI SELECIONADO PARA COMPROVAÇÃO DA RESISTÊNCIA COM ISOLADOS DE <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (TSWV), <i>CHRYSANTHEMUM STEM NECROSIS VIRUS</i> (CSNV), <i>TOMATO CHLOROTIC SPOT VIRUS</i> (TCSV) E GRSV. ....	<b>60</b>
<b>TABELA 2.</b> REAÇÃO DE ACESSOS DE <i>SOLANUM</i> (SECÇÃO <i>LYCOPERSICON</i> ) PREVIAMENTE SELECIONADOS INOCULADOS MECANICAMENTE COM ISOLADOS DE <i>GROUNDNUT RINGSPOT VIRUS</i> (GRSV), <i>CHRYSANTHEMUM STEM NECROSIS VIRUS</i> (CSNV), <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (TSWV) E <i>TOMATO CHLOROTIC SPOT VIRUS</i> (TCSV) ANALISADOS ATRAVÉS DE ELISA E/OU OBSERVAÇÃO DE SINTOMAS. ....	<b>63</b>

## CAPÍTULO 4

<b>TABELA 1.</b> CÓDIGOS, SEQUÊNCIAS E TAMANHO ESPERADO DOS AMPLICONS DE UM PAINEL DE <i>PRIMERS</i> DERIVADO DA SEQUÊNCIA DO LÓCUS <i>Sw-5</i> (ACESSO AY007366).....	<b>72</b>
--	-----------

## CAPÍTULO 5

<b>TABELA 1.</b> LISTA DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES N, NSS E NSM DE TSWV PARA A MONTAGEM DAS CONSTRUÇÕES EM PVX .....	<b>88</b>
<b>TABELA 2.</b> <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS PARA REGIÕES DOS GENES N, NSS E NSM DE TSWV UTILIZADOS PARA A VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DOS INSERTOS EM CONSTRUÇÕES DE PVX INFILTRADAS EM PLANTAS DE TABACO EXPRESSANDO O GENE <i>SW-5</i> .....	<b>94</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1

- FIGURA 1.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA DE UM TOSPOVÍRUS. A MEMBRANA LIPÍDICA CONTÉM AS GLICOPROTEÍNAS (GN E Gc). AS TRÊS ESTRUTURAS LOCALIZADAS NA PARTE INTERNA CORRESPONDEM ÀS RIBONUCLEOPROTEÍNAS (RNPs), FORMADAS POR RNA VIRAL ENCAPSIDADO PELA PROTEÍNA N E A POLIMERASE (L) (ADAPTADA DE HOGENHOUT *ET AL.*, 2008). ..... 16
- FIGURA 2.** ESTRATÉGIA DE EXPRESSÃO DO GENOMA DE TOSPOVÍRUS. **vrna** = RNA SENTIDO VIRAL; **vcRNA** = RNA SENTIDO COMPLEMENTAR; **L** = POLIMERASE VIRAL; **Gc** E **Gn** = GLICOPROTEÍNAS; **N** = PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO; **Nsm** = PROTEÍNA DE MOVIMENTO; **Nss** = PROTEÍNA NÃO-ESTRUTURAL ..... 17
- FIGURA 3.** SINTOMAS TÍPICOS DE INFECÇÃO POR TOSPOVÍRUS EM PLANTAS DE TOMATEIRO. **(A)** SINTOMAS AVANÇADOS EM FOLHAS, PECÍOLOS E HASTES. **(B)** SINTOMAS EM FRUTOS (FONTE: SAIDI & WARADE, 2008). ..... 18
- FIGURA 4.** PLANTA DE PIMENTA (*CAPSICUM* SP.) APRESENTANDO SINTOMAS INTENSOS DE INFECÇÃO POR PEPYMV. .... 26
- FIGURA 5.** PARTÍCULAS PURIFICADAS DE POTYVÍRUS (FONTE: [HTTP://WWW.DPVWEB.NET/INTRO/A1.GIF](http://www.dpvweb.net/intro/a1.gif) EM 11/03/2009). ..... 27
- FIGURA 6.** MAPA GENÔMICO DOS POTYVÍRUS. AS SETAS INDICAM OS SÍTIOS DE CLIVAGEM (FONTE: [HTTP://WWW.DPVWEB.NET/POTYCLEAVAGE/POTYVIRUSMAP.GIF](http://www.dpvweb.net/potycleavage/potyvirusmap.gif) EM 11/03/2009).ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO. .... 27
- FIGURA 7.** INCLUSÕES EM CATA-VENTO FORMADAS A PARTIR DO ACÚMULO DE PROTEÍNAS DE POTYVÍRUS EM CÉLULAS INFECTADAS (FONTE: [HTTP://MCB.WEB.PSI.CH/TEACHING/VIROLOGY/PLANTSPOEGGELER\\_05\\_FILES/SLIDE0055\\_IMAGE071.JPG](http://mcb.web.psi.ch/teaching/virology/plantspoeggeler_05_files/slide0055_image071.jpg) EM 11/03/2009). ..... 28
- FIGURA 8.** AFÍDEOS NA FACE INFERIOR DE UMA FOLHA DE TOMATEIRO (FONTE: [HTTP://WWW.CES.NCSU.EDU/CHATHAM/AG/SUSTAG/GSFGRAPHICS/APHIDS.JPG](http://www.ces.ncsu.edu/chatham/ag/sustag/gsfgraphics/aphids.jpg) EM 11/03/2009). ..... 29

## CAPÍTULO 2

- FIGURA 1.** SINTOMAS DE MOSAICO EM PLANTA DE TOMATEIRO INFECTADO COM *PEPPER YELLOW MOSAIC VIRUS* EM PLANTIO DA REGIÃO PRODUTORA DA TAQUARA / D.F. .... 44
- FIGURA 2.** FOLHA DE TOMATEIRO DA CULTIVAR 'ALAMBRA', POSITIVA EM ELISA PARA PEPYMV, APRESENTANDO SINTOMAS SUAVES DE MOSAICO. .... 48

## CAPÍTULO 3

- FIGURA 1.** ACESSO DE TOMATE SELVAGEM DA ESPÉCIE *S. PERUVIANUM* APRESENTANDO LESÃO LOCAL NECRÓTICA RESULTANTE DE REAÇÃO DE RESISTÊNCIA APÓS INOCULAÇÃO COM ISOLADO BR-01 DE *TOMATO SPOTTED WILT VIRUS*. ..... 62

## CAPÍTULO 4

<b>FIGURA 1.</b> PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR EM GEL DE AGAROSE 1% (TAMPÃO TBE) OBTIDO COM OS PRIMERS 'SW-5-2'. ENSAIOS FORAM REALIZADOS UTILIZANDO-SE DE DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DE 14 ACESSOS DE <i>SOLANUM</i> (SEÇÃO <i>LYCOPERSICON</i> ).....	<b>76</b>
<b>FIGURA 2.</b> REAÇÃO EM ENSAIO DE CAMPO A INFEÇÃO POR <i>GROUNDNUT RINGSPOT VIRUS</i> (GRSV) DE (A) LINHAGEM QUASE-ISOGÊNICA 'SANTA CLARA R' (SEM SINTOMAS), QUE FOI HOMOZIGOTA PARA O AMPLICON RESISTENTE DERIVADO DE <i>Sw-5</i> OBTIDO APÓS ENSAIOS DE PCR UTILIZANDO O PAR DE PRIMERS 'SW-5-2' E (B) LINHAGEM DERIVADA DE RETROCRUZAMENTO 'SANTA CLARA S' (APRESENTANDO NECROSE APICAL E NANISMO DEVIDO A INFEÇÃO POR GRSV), QUE FOI HOMOZIGOTA PARA O AMPLICON SUSCETÍVEL DERIVADO DE <i>Sw-5</i> OBTIDO APÓS ENSAIOS DE PCR UTILIZANDO O PAR DE PRIMERS 'SW-5-2'. ESTE PAR DE PRIMERS FOI DESENVOLVIDO PARA SE COMBINAR COM SEQUÊNCIAS DO LÓCUS <i>Sw-5</i> (RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS) DE TOMATE.....	<b>78</b>
<b>FIGURA 3.</b> COMPARAÇÃO DO SEGMENTO COMPLETO DOS AMPLICONS 'SW-5-2' CLONADOS OBTIDOS DE DNA GENÔMICO DE <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> DAS CULTIVARES 'VIRADORO' (574 PB) E 'IPA-5' (464 PB).....	<b>80</b>
<b>FIGURA 4.</b> COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE AMPLICONS OBTIDOS COM OS PRIMERS 'SW-5-2' UTILIZANDO-SE DE DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DE 14 ACESSOS DE <i>SOLANUM</i> (SEÇÃO <i>LYCOPERSICON</i> ).....	<b>82</b>

## CAPÍTULO 5

<b>FIGURA 1.</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CONSTRUÇÕES EM pGR107 COM TRÊS GENES DE <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (N, Nss e Nsm).....	<b>90</b>
<b>FIGURA 2.</b> VETORES DO SISTEMA GATEWAY® UTILIZADOS NESSE EXPERIMENTO, pENTR2B (A) (VETOR DE ENTRADA) E PK2GW7 (B)(VETOR DE DESTINO).....	<b>91</b>
<b>FIGURA 3.</b> REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE OBSERVADA EM FOLHAS DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> TRANSFORMADAS COM O GENE <i>Sw-5B</i> DE TOMATE APÓS INOCULAÇÃO MECÂNICA COM O ISOLADO BR-01 DE <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (TSWV).....	<b>96</b>
<b>FIGURA 4.</b> SINTOMAS TÍPICOS DE INFEÇÃO SISTÊMICA CAUSADA POR <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (TSWV) EM <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> TRANSGÊNICA EXPRESSANDO O GENE <i>Sw-5B</i> APÓS INOCULAÇÃO MECÂNICA COM O ISOLADO JF1, CAPAZ DE QUEBRAR A RESISTÊNCIA CONFERIDA POR ESTE GENE.....	<b>96</b>
<b>FIGURA 5.</b> PLANTAS TRANSGÊNICAS DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> TRANSFORMADAS COM O GENE <i>Sw-5</i> QUE CONFERE RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS, AGROINFILTRADAS COM CONSTRUÇÕES DO VETOR PVX CONTENDO O GENE N (PVX + N) (A) E O GENE Nsm DE <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (TSWV) (PVX + Nsm) (B) APRESENTANDO SOMENTE SINTOMAS TÍPICOS DE INFEÇÃO POR PVX SEM A OCORRÊNCIA DE REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE.....	<b>99</b>
<b>FIGURA 6.</b> <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> TRANSGÊNICA TRANSFORMADA COM O GENE <i>Sw-5</i> QUE CONFERE RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS (A) E PLANTA NÃO-TRANSFORMADA (B) AGROINFILTRADAS COM CONSTRUÇÕES DO VETOR PVX CONTENDO A PROTEÍNA Nss (PVX + Nss) DE <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (TSWV). OBSERVA-SE A EXPRESSÃO INTENSIFICADA DE SINTOMAS DE PVX NOS DOIS TIPOS DE PLANTAS.....	<b>99</b>
<b>FIGURA 7.</b> ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DAS CONSTRUÇÕES PVX + GENE N (A), PVX + Nsm (B) E PVX + Nss (C) DE <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (TSWV) EM GEL DE AGAROSE 1% VIA RT-PCR COM PRIMERS ESPECÍFICOS PARA ESSAS REGIÕES GENÔMICAS.....	<b>100</b>
<b>FIGURA 8.</b> ANÁLISE EM WESTERN BLOTS DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS N (A), Nsm (B) E Nss (C) DE <i>TOMATO SPOTTED WILT VIRUS</i> (TSWV) AGROINFILTRADAS EM <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> ATRAVÉS DE CONSTRUÇÕES USANDO O VETOR PVX.....	<b>101</b>

## Lista de siglas e abreviações

**CMV** – *Cucumber mosaic virus*  
**CNPq** – Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças  
**CSNV** – *Chrysanthemum stem necrosis virus*  
**cv.** – cultivar  
**DF** – Distrito Federal  
**DNA** – ácido desoxirribonucléico  
**f. sp.** – forma specialis  
**g** – gramas  
**GRSV** – *Groundnut ringspot virus*  
**kb** – mil pares de bases  
**L** – litros  
**M** – molar  
**mg** – miligramas  
**mL** – mililitros  
**mM** – milimolar  
**nm** – nanômetros  
**p/v** – peso/volume  
**PCR** – reação em cadeia da polimerase  
**PepYMV** – *Pepper yellow mosaic virus*  
**pv.** – patovar  
**PVX** – *Potato virus X*  
**PVY** – *Potato virus Y*  
**RNA** – ácido ribonucléico  
**RPM** – rotações por minuto  
**sp.** – espécie  
**spp.** – espécies  
**ssRNA** – fita simples de ácido ribonucléico  
**TCSV** – *Tomato chlorotic spot virus*  
**TSWV** – *Tomato spotted wilt virus*  
**UTR** – região não traduzida  
**var.** – variedade  
**µg** – microgramas  
**µL** – microlitros

## RESUMO

Diversas doenças de etiologia viral têm sido relatadas afetando a tomaticultura em todo mundo causando importantes perdas qualitativas e quantitativas. Dentre as principais doenças viróticas estão as causadas pelo gênero *Tospovirus* e pelo gênero *Potyvirus*. Os tospovírus (família *Bunyaviridae*) são responsáveis pela doença conhecida como “vira-cabeça” que causa severas perdas anuais. Espécies desse gênero possuem distribuição mundial e apresentam grande diversidade de espécies infectando uma vasta gama de hospedeiros. O principal fator de resistência empregado no melhoramento genético do tomateiro para resistência ampla a diferentes espécies de tospovírus é o gene *Sw-5*. Plantas com este gene apresentam reações de hipersensibilidade nas folhas inoculadas que restringem a infecção viral sistêmica. Porém, a ‘quebra’ deste gene de resistência já foi reportada em diferentes partes do mundo. Além dos tospovírus, espécies do gênero *Potyvirus* representam uma constante ameaça à cultura do tomate. Uma nova espécie de *Potyvirus*, o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), foi identificada inicialmente em pimentão, mas também é capaz de afetar tomateiros, hospedeiro no qual pode causar perdas de até 100%. Trabalhos de buscas de fontes de resistência a PepYMV em tomate já foram iniciadas, mas o germoplasma explorado ainda representa um número reduzido de acessos. Esta tese apresenta a avaliação de coleções de germoplasma visando identificar novas fontes de resistência tanto a PepYMV quanto às espécies neotropicais de *Tospovirus*. Além disso, foi desenvolvido um marcador co-dominante para o gene *Sw-5*, capaz de identificar indivíduos resistentes através de uma simples PCR. Foi também realizada uma análise preliminar do componente de avirulência da interação *Sw-5/ Tomato spotted wilt virus* (TSWV) através do uso de construções contendo os genes independentes de TSWV, isolados BR-01 (avirulento ao gene *Sw-5*) e o isolado GRAU (capaz de quebrar a resistência conferida por *Sw-5*), em uma plataforma baseada em *Nicotiana benthamiana* transgênica expressando o gene *Sw-5*. Em relação à identificação de novas fontes de resistência a potyvírus e tospovírus (Capítulos 2 e 3, respectivamente), acessos de *S. habrochaites* se mostraram como fontes promissoras de resistência a

PepYMV bem como a *Potato virus Y* (PVY). Por outro lado, acessos de *S. peruvianum* confirmaram esta espécie como a principal fornecedora de fatores de resistência a tospovírus. Observou-se que um acesso de *S. chilense*, bem como uma seleção de um acesso de *S. lycopersicum*, apresentaram bons níveis de resistência/tolerância às espécies de tospovírus testadas. Ambas as análises foram comparadas com levantamentos previamente realizados por outros grupos. O marcador específico para Sw-5 (Capítulo 4) foi avaliado em uma ampla gama de acessos, apresentando um perfil único capaz de distinguir acessos resistentes e suscetíveis em todas as situações, comprovando sua eficiência como uma nova ferramenta para sistemas de seleção assistida e, mesmo para potencial isolamento de alelos ou análogos deste gene em tomate e outras solanáceas. A análise do componente de avirulência do TSWV (Capítulo 5) apontou que nenhum dos genes virais avaliados (Nsm, os precursores das glicoproteínas, N e Nss) parece estar envolvido, de maneira independente, com o processo de indução do mecanismo de reconhecimento pelo gene Sw-5. Nenhum dos genes testados induziu a reação típica de hipersensibilidade característica da infecção causada por TSWV em genótipos contendo esse gene de resistência. A estratégia usada nesse estudo também demonstrou que o modelo biológico representado por *N. benthamiana* transgênica, expressando uma cópia ativa do gene Sw-5, é adequada para o estudo de mecanismos envolvidos com a resistência a tospovírus, assim como para o estudo da superação dessa resistência por isolados virulentos.

## ABSTRACT

Many diseases of viral etiology have been identified affecting tomato production worldwide, causing important qualitative and quantitative losses. Among the main viral diseases, there are the ones caused by the genus *Tospovirus* and the genus *Potyvirus*. The *Tospovirus* (family *Bunyaviridae*) are responsible for the disease known as “vira-cabeça”, causing severe annual losses, mainly in horticultural crops. Species of this genus have a worldwide distribution and a great number of species infecting a vast array of hosts. The main resistance factor employed in tomato breeding for broad spectrum resistance to different tospovirus species is the *Sw-5* gene. Plants that harbor this gene express hypersensitivity reactions that restrict the viral systemic infection. However, the ‘breaking’ of this resistance gene has already been reported in different parts of the world. Apart from tospoviruses, species of the genus *Potyvirus* represent a constant threat to tomato culture. A new species of this genus, *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), was initially identified in pepper but it is also capable of infecting tomatoes, causing up to 100% losses. The search for resistance sources for PepYMV on tomato have already started, but the explored germplasm still represents a reduced number of accessions. This thesis shows the evaluation of germplasm collections seeking to identify new resistance sources to PepYMV and to the neotropical species of tospoviruses. Beyond that, a co-dominant marker for the *Sw-5* gene was developed, capable of identifying resistant individuals through a simple PCR. A preliminary analysis of the avirulence component of the *Sw-5/ Tomato spotted wilt virus* (TSWV) interaction was also done, using constructions containing independent TSWV genes, isolates BR-01 (avirulent for the *Sw-5* gene) and GRAU (capable of breaking the *Sw-5* gene resistance), using a platform based on transgenic *Nicotiana benthamiana* expressing the *Sw-5* gene. In relation to the identification of the new resistance sources (Chapters 2 and 3, respectively), accessions of *S. habrochaites* showed to be promising sources of resistance to both PepYMV and *Potato virus Y* (PVY). On the other hand, accessions of *S. peruvianum* confirmed this species as the main source of resistance factors to tospoviruses. An accession of *S. chilense* and a selection of an accession of

*S. lycopersicum*, showed good resistance/tolerance levels to the tospovirus species tested. Both analyses were compared to screenings that were previously done. The *Sw-5* specific marker (Chapter 4) was evaluated with a broad array of accessions, showing a profile capable of identifying resistant and susceptible accessions in all situations. Therefore, this marker represents an efficient new tool for assisted selection systems and its future potential use for isolation or detection of alleles or analogous genes in tomato and other solanaceous species. The avirulence component analysis showed that none of the viral genes that were evaluated (Nsm, the glycoprotein precursors, N and Nss) seems to be related in an independent manner with the induction process of the *Sw-5* gene recognition mechanism. None of the genes tested was able to induce typical hypersensitive reaction observed when tomato genotypes containing this resistance gene are challenged by TSWV. The strategy used in this study also demonstrated that the biological model represented by transgenic *N. benthamiana* expressing an active copy of the *Sw-5* gene is suitable for analyzing the mechanisms involved in tospovirus resistance. In addition, this system can also be used to investigate *Sw-5*-resistance breaking isolates.

## INTRODUÇÃO GERAL

O tomate foi recentemente agrupado no gênero *Solanum* (Peralta *et al.*, 2006) e é uma das hortaliças mais plantadas no mundo. No Brasil, o cultivo do tomate ocupa uma área de 56.275 hectares e obteve uma produção de 3.356.456 toneladas no ano de 2007. A área plantada, bem como o grande volume dessa produção, colocaram o país na nona posição em se tratando da produção mundial dessa hortaliça, com a Região Sudeste sendo a maior produtora, com 43% do total produzido (CNPQ, 2008).

Em 1753, Linnaeus descreveu três espécies de indivíduos hoje reconhecidos como tomates e os alocou no gênero *Solanum* (*S. lycopersicum* L., *S. peruvianum* L. e *S. pimpinellifolium* L.). Philip Miller (1754) segregou o novo gênero *Lycopersicon* para acomodar as espécies de *Solanum* com frutos multi-loculares (Darwin *et al.*, 2003). Os centros de origem são as regiões andinas do Peru, Bolívia, Equador, Sul da Colômbia e Ilhas Galápagos (Fontes & Silva, 2002; Darwin *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 2005).

Análises de características morfológicas e moleculares demonstraram que os tomates pertencem a um grupo extremamente próximo das batatas (Spooner *et al.*, 1993; Peralta & Spooner, 2001). Peralta *et al.* (2006), após análise dos dados acumulados nesse período, reagruparam os tomates no gênero *Solanum*, baseando-se em análises de seqüências de DNA e características morfológicas e de distribuição.

O tomateiro é originário da região Andina, que corresponde o norte do Chile até o Equador. Foi introduzido na Espanha, a partir do México, no século XVI, sendo que no século XVIII já era largamente consumido em vários países europeus. Nos dias de hoje é considerado um alimento universal (Giordano & Ribeiro, 2000).

Mais de duzentas doenças e distúrbios fisiológicos foram relatados afetando a tomaticultura em todo mundo e as causadas por vírus merecem destaque. Dentre as principais doenças viróticas que atacam o tomateiro estão as causadas por begomovírus, cucumovírus, tobamovírus e com especial destaque para as causadas pelo gênero *Tospovirus* e pelo gênero *Potyvirus* (de Ávila, 1993).

Os tospovírus (família *Bunyaviridae*) são responsáveis pela doença conhecida como “vira-cabeça-do-tomateiro” que causa perdas anuais em cultivos de tomates de mesa e para processamento (de Ávila, 1993). Esses vírus são transmitidos por tripses de maneira circulativa/propagativa (Wijkamp *et al.*, 1993). Espécies desse gênero possuem distribuição mundial e apresentam grande diversidade de espécies virais infectando uma vasta gama de hospedeiros. O *Groundnut ringspot virus* (GRSV) é a espécie de tospovírus prevalente no Brasil em plantios de tomate e as plantas suscetíveis geralmente apresentam sintomas de bronzeamento e/ou manchas em anéis cloróticos nas folhas, necrose de pecíolos, anéis necróticos em frutos, necrose generalizada e etc. (Lopes & de Ávila, 2005).

O genoma dos tospovirus é formado por três RNAs de fita simples denominados RNAs L (senso negativo), M (ambisenso) e S (ambisenso) e a proteína N que forma o nucleocapsídeo viral (de Ávila, 1993; Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003; Snippe *et al.*, 2007). As extremidades dos três RNAs são complementares entre si, formando uma estrutura pseudo-circular mais estável denominada “cabo de panela” (de Haan *et al.*, 1989).

Em 1988, introduziu-se nas áreas de plantio de tomate a cultivar Stevens, derivada de cruzamentos com *S. peruvianum*, contendo o gene *Sw-5* que confere resistência ampla a tospovírus (Boiteux *et al.*, 1993). Plantas que possuem o gene *Sw-5* restringem a infecção sistêmica do vírus e as folhas inoculadas apresentam somente sintomas localizados, como lesões locais, por hipersensibilidade, características de resistência conferida por genes dominantes (Brommonschenkel *et al.*, 2000). O gene *Sw-5* pertence à mesma classe de genes de resistência do gene *Mi*, *I2*, *RPM1* e vários outros. Essa classe de genes de resistência é denominada CC-(NB-ARC)-LRR, e como característica chave, apresenta regiões ricas no aminoácido leucina e sítios altamente conservados de ligação de nucleotídeos (Spasova *et al.*, 2001; Brommonschenkel *et al.*, 2000).

Em 2003, Aramburu *et al.* reportaram a ocorrência de um novo isolado de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) capaz de quebrar a resistência de plantas de tomate contendo o gene *Sw-5* no nordeste da Espanha. Fato esse confirmado em 2005, por Ciuffo *et al.* que relataram à ocorrência de tal isolado em regiões produtoras de tomate da Itália. O isolado espanhol,

denominado GRAU, é o primeiro isolado de TSWV capaz de quebrar a resistência conferida por *Sw-5* e, aparentemente, se estabelecer nas áreas de cultivo.

Além dos tospovírus, espécies do gênero potyvírus representam uma constante ameaça à cultura do tomate. Este gênero é considerado o maior e mais importante gênero de vírus de plantas (Hull, 2002). O *Potato virus Y* (PVY), a espécie tipo, é um vírus de grande importância na cultura do pimentão e da pimenta (Nagai, 1968). No início da década de 70, a introdução de cultivares resistentes causou a diminuição da importância deste vírus, apesar dessa resistência ser quebrada com frequência por novos isolados (Nagai, 1983). O uso intenso dessas cultivares, levou a seleção e emergência de isolados virulentos considerados como variantes do PVY capazes de suplantar esta resistência, como o PVY<sup>m</sup>. Essa estirpe foi posteriormente caracterizada como sendo uma nova espécie de *Potyvirus*, o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) que foi identificado inicialmente em pimentão mas também é capaz de afetar tomateiros (Inoue-Nagata *et al.*, 2002). Este potyvírus pode causar perdas de até 100%, como relatado em regiões produtoras do Espírito Santo, mais especificamente em plantios da cultivar Alambra (de Ávila *et al.*, 2004; Maciel-Zambolim *et al.*, 2004).

O genoma é formado por RNA fita simples senso positivo que codifica uma poliproteína e é transmitido de maneira não-persistente por afídeos (Hull, 2002). Plantas suscetíveis apresentam mosaico severo e deformação foliar, sendo que, em plantas tolerantes é comum o desenvolvimento de mosaico leve e amarelecimento de folhas novas. Os frutos não apresentam sintomas, mas se tornam pouco desenvolvidos (Lopes & de Ávila, 2005).

Até o momento não foram identificadas fontes de resistência em tomate para o PepYMV. Alguns levantamentos já foram realizados (Juhász *et al.*, 2006), porém, sem conclusões definitivas, apontando como possível fonte de resistência acessos selvagens da espécie *Solanum habrochaites*.

Visando aprofundar o conhecimento científico em relação a fontes de resistência a *Pepper yellow mosaic virus* e às espécies de tospovírus que agem nos neotrópicos infectando tomates, bem como analisar os mecanismos da interação patógeno/hospedeira e o desenvolvimento de um

novo marcador para uso em melhoramento de tomateiros baseado no gene Sw-5, esse trabalho traçou objetivos a serem alcançados.

## ***Capítulo 1***

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. Características da Cultura

O tomateiro é originário das Américas, mais precisamente da região Andina, que corresponde o norte do Chile até o Equador. Foi introduzido na Espanha, a partir do México, no século XVI, sendo que no século XVIII já era largamente consumido em vários países europeus. Nos dias de hoje é considerado um alimento universal. Seu fruto possui em sua composição aproximadamente 93 a 95% de água. Nos 5% a 7% restantes, encontram-se compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em álcool e outros compostos, merecendo destaque a alta concentração de licopeno, que apresenta eficiência na prevenção de câncer e fortalecimento do sistema imunológico. Em relação às características nutricionais, o tomate apresenta vitaminas C, A e do complexo B, mesmo na pequena proporção total de matéria seca (Giordano & Ribeiro, 2000).

A temperatura mínima para o cultivo está entre 8° C e 11° C, sendo que a temperatura ótima para germinação está entre 16° C e 29° C (Geisenberg & Stewart, 1986). A planta suporta uma amplitude de 10° C a 34° C, sendo que a média ideal deve ser de 21° C, dando-se preferência para o plantio em épocas ou em locais de pouca precipitação pluvial e baixa umidade relativa do ar (Giordano & Silva, 2000). O solo deve ser profundo, de fácil drenagem, areno-argiloso, com teor de matéria orgânica em torno de 3% e níveis adequados de nutrientes (Fontes, 2000).

O tomate foi recentemente agrupado no gênero *Solanum* (Peralta *et al.*, 2006) e é uma das hortaliças mais plantadas no mundo. Os principais exportadores mundiais são México, Turquia, Estados Unidos, União Européia, Canadá e China e os principais importadores são Estados Unidos, Rússia, União Européia e Canadá ([www.fas.usda.gov](http://www.fas.usda.gov), em 14/08/2007). No Brasil, o cultivo do tomate ocupa uma área de 56.275 hectares e obteve uma produção de 3,3 milhões de toneladas no ano de 2007. A área plantada, bem como o grande volume dessa produção, colocaram o país na nona posição em se tratando da produção mundial dessa hortaliça, com a Região Sudeste sendo a maior produtora, com 43% do total produzido, colocando o tomate na segunda colocação em se tratando da produção de olerícolas no país, ficando atrás apenas da batata (*Solanum tuberosum* L.) (CNPH, 2008). Estes

e outros fatos reforçam, ainda mais, a necessidade de tecnologias capazes de melhorar a produção por meio de novas cultivares resistentes a doenças e de novas ferramentas moleculares, para facilitar a identificação e manipulação dos genes responsáveis por tais resistências.

Em 1753, Linnaeus descreveu três espécies de indivíduos hoje reconhecidos como tomates e os alocou no gênero *Solanum* (*S. lycopersicum*, *S. peruvianum* L. e *S. pimpinellifolium*). Philip Miller (1754), um contemporâneo de Linnaeus, segregou o novo gênero *Lycopersicon* para acomodar as espécies de *Solanum* com frutos multi-loculares, incluindo-se os tomates, a batata (*S. tuberosum* L.) e diversas outras espécies (Darwin *et al.*, 2003). Os centros de diversidade são as regiões andinas do Peru, Bolívia, Equador, Sul da Colômbia e Ilhas Galápagos (Fontes & Silva, 2002; Darwin *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 2005).

A classificação dos tomates dentro do gênero *Lycopersicon* foi mantida por vários botânicos (modernos e clássicos) e melhoristas, mas nem sempre essa informação era unânime. O próprio Linnaeus (1753), em seu trabalho original sobre a classificação dessa espécie, os incluiu como membros do gênero *Solanum* e diversos taxonomistas reconheciam que os tomates estavam classificados dentro do gênero *Solanum* e não no então segregado gênero *Lycopersicon* (Fosberg, 1987; Child, 1990).

Análises de características morfológicas e moleculares, através do estudo genômico de cloroplastos, demonstraram que os tomates pertencem a um grupo extremamente próximo das batatas (Spooner *et al.*, 1993; Peralta & Spooner, 2001). Peralta *et al.*, (2006), após análise dos dados acumulados nesse período, reagruparam os tomates no gênero *Solanum*, baseando-se em análises de seqüências de DNA e características morfológicas e de distribuição. Atualmente, as espécies de tomate estão alocadas no gênero *Solanum* seção *Lycopersicon*, abrangendo 17 espécies (Tabela 1), sendo que a maioria destas é silvestre e não é utilizada na agricultura por produzir frutos de pequeno porte, pubescentes ou de sabor desagradável. Apesar disso, algumas espécies são exploradas em programas de melhoramento para a incorporação de caracteres de resistência a pragas ou de aspectos nutritivos (Aragão *et al.*, 2002; Gordillo *et al.*, 2008).

**Tabela 1.** Listagem de espécies de tomate e equivalentes no previamente reconhecido gênero *Lycopersicon* e o modo de reprodução de cada espécie (modificado de Peralta *et al.*, 2006).

Nome da espécie	Equivalente em <i>Lycopersicon</i>	Reprodução*
<i>Solanum lycopersicoides</i> Dunal	<i>Lycopersicon lycopersicoides</i> (Dunal em D.C.) A. Child ex J.M.H. Shaw	AI, alógama
<i>Solanum sitiens</i> I.M. Johnst.	<i>Lycopersicon sitiens</i> (I.M. Johnst.) J.M.H. Shaw	AI, alógama
<i>Solanum juglandifolium</i> Dunal	<i>Lycopersicon ochranthum</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	AI, alógama
<i>Solanum ochrantum</i> Dunal	<i>Lycopersicon juglandifolium</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	AI, alógama
<i>Solanum pennelli</i> Correll	<i>Lycopersicon pennelli</i> (Correll) D'Arcy	Usualmente AI, algumas AC
<i>Solanum habrochaites</i> S. Knapp & D.M. Spooner	<i>Lycopersicon hirsutum</i> Dunal	Tipicamente AI
<i>Solanum chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>Lycopersicon chilense</i> Dunal	AI, alógama
<i>Solanum huaylasense</i> Peralta & S. Knapp	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Tipicamente AI, alógama
<i>Solanum peruvianum</i> L.	<i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Tipicamente AI, alógama
<i>Solanum corneliomuelleri</i> J.F. Macbr	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller; também conhecida como <i>L. glandulosum</i> C.F. Müll.	Tipicamente AI, alógama
<i>Solanum arcanum</i> Peralta	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Tipicamente AI, alógama, raramente AC, autógama, alógama facultativa
<i>Solanum chmeilewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>Lycopersicon chmeilewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	AC, alógama facultativa
<i>Solanum neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	<i>Lycopersicon parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	AC, altamente autógama
<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (L.) Miller	AC, autógama, alógama facultativa
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller	AC, autógama, alógama facultativa
<i>Solanum cheesmaniae</i> (L.)	<i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L.	AC, exclusivamente

Riley) Fosberg	Riley	autógama
<i>Solanum galapagense</i> S.C. Darwin & Peralta	Parte de <i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley	AC, exclusivamente autógama

---

\* AI = Auto-incompatível, AC = Auto-compatível

Mais de duzentas doenças e distúrbios fisiológicos foram relatados afetando a tomaticultura em todo mundo e as causadas por vírus merecem destaque. Dentre as principais doenças viróticas que atacam o tomateiro estão as causadas por begomovírus, cucumovírus, tobamovírus e com especial destaque para as causadas pelo gênero *Tospovirus* e pelo gênero *Potyvirus* (de Ávila, 1993).

## 2. *Tospovirus*

Os *Tospovirus* são responsáveis pela doença conhecida como “*spotted wilt*”, “peste negra” (Williams *et al.*, 2001) e “vira-cabeça-do-tomateiro” (Silberschmidt, 1937) que causa perdas anuais em cultivos de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) de mesa e para processamento em todo o mundo (Gordillo *et al.*, 2008). Essas perdas superam a marca de 1 bilhão de dólares e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) figura entre os dez mais importantes vírus para a agricultura (Goldbach & Peters, 1994). Esses vírus fazem parte da família *Bunyaviridae*, tipicamente formada por vírus com genoma de RNA tripartido, envelopado e que infectam animais (Goldbach & Peters, 1996). Atualmente, 14 espécies de tospovírus são reconhecidas e aprovadas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), sendo 8 estabelecidas e 11 tentativas (Fauquet *et al.*, 2005) (Tabela 2). Atualmente, o índice de 90% de identidade da seqüência da proteína do nucleocapsídeo (N) é utilizado como critério para se definir novas espécies de tospovírus, apesar de que o relacionamento sorológico, especificidade de transmissão por vetores, sintomatologia e gama de hospedeiros também

serem importantes fatores observados na definição de novas espécies deste gênero (de Ávila *et al.*, 1993; Resende, 1995; Roselló *et al.*, 1996).

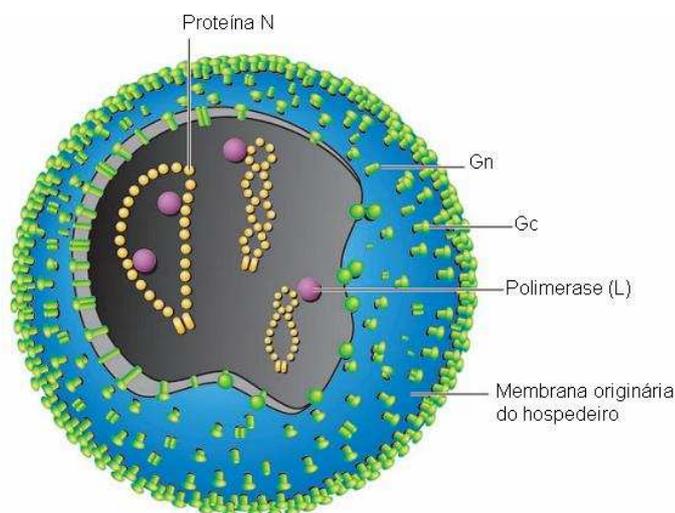
**Tabela 2.** Espécies de *Tospovirus*, espécies de tripses vetores e distribuição geográfica dos mesmos (modificada de Mehraban, 2008).

Espécie de <i>Tospovirus</i>	Vetor	Distribuição geográfica
<b>Estabelecidas</b>		
<i>Groundnut bud necrosis virus</i> (GBNV)	<i>Thrips palmi</i> , <i>Frankliniella schulzei</i>	Índia, Sudeste da Ásia
<i>Groundnut ring spot virus</i> (GRSV)	<i>F. gemina</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. occidentalis</i>	América do Sul, África do Sul EUA, Oeste e Sul da Europa
<i>Impatiens necrotic spot virus</i> (INSV)	<i>F. occidentalis</i>	Índia, Tailândia
<i>Peanut yellow spot virus</i> (PYSV)	Não conhecido	
<i>Tomato chlorotic spot virus</i> (TCSV)	<i>F. occidentalis</i> , <i>F. intonsa</i> , <i>F. schultzei</i>	América do Sul
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	<i>F. bispinosa</i> , <i>F. fusca</i> , <i>F. cephalica</i> , <i>F. gemina</i> , <i>F. intonsa</i> , <i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. setosus</i> , <i>T. tabaci</i>	Mundial
<i>Watermelon silver mottle virus</i> (WSMoV)	<i>T. palmi</i>	Japão, Taiwan
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> (ZLCV)	<i>F. zucchini</i>	Brasil
<b>Tentativas</b>		
<i>Calla lily chlorotic spot virus</i> (CCSV)	<i>T. palmi</i>	Taiwan
<i>Capsicum chlorosis virus</i> (CaCV)	<i>Ceratothripoides claratris</i>	Austrália, Tailândia
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> (CSNV)	<i>F. occidentalis</i>	Brasil
<i>Iris yellow spot virus</i> (IYSV)	<i>T. tabaci</i>	Brasil, Israel, Holanda, EUA
<i>Melon severe mosaic virus</i> (MeSMV)	Não conhecido	México
<i>Melon yellow spot virus</i> (MYSV)	<i>T. palmi</i>	Taiwan, Japão
<i>Peanut chlorotic fan-spot virus</i> (PCFV)	<i>Scirtothrips dorsalis</i>	Taiwan
<i>Tomato fruit yellow ring virus</i> (TFYRV)	<i>T. tabaci</i>	Irã
<i>Tomato yellow ring virus</i> (TYRV)	<i>T. tabaci</i>	Irã
<i>Tomato zonate spot virus</i> (TZSV)	Não conhecido	China
<i>Watermelon bud necrosis virus</i> (WBNV)	<i>T. palmi</i>	Índia

As espécies que causam essa virose em tomate e que foram identificadas no Brasil são: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (Resende *et al.*, 1996). Esses vírus são transmitidos por tripes de maneira circulativa/propagativa e só pode ser adquirido durante o primeiro e o segundo estágios larvais (Wijkamp *et al.*, 1995). Das 5000 espécies de tripes existentes, nove são consideradas vetores virais (Mound, 1996). Tripes adultos não se tornam virulíferos, mesmo após períodos de alimentação prolongados em plantas infectadas (van de Wetering *et al.*, 1996). Adultos alados vivem por 30 a 45 dias, período pelo qual podem transmitir o vírus. Após a aquisição, o vírus chega até as células epiteliais do intestino médio, onde se replica. A partir deste ponto, as partículas virais vão até as glândulas salivares (Nagata *et al.*, 1999). O GRSV é a espécie de tospovírus prevalente no Brasil devido à presença do vetor *Frankliniella schultzei* nas regiões produtoras e a alta eficiência de transmissão dessa espécie de tospovírus por essa espécie de tripes (Nagata *et al.*, 2004).

As partículas virais são esféricas e envolvidas por uma membrana lipídica, denominada envelope, e associadas a essa membrana estão as glicoproteínas Gc e Gn, responsáveis pela interação do vírus com seu vetor, determinando a transmissão e a especificidade (Wijkamp *et al.*, 1995; Ullman *et al.*, 2005). A parte interna da partícula é composta pelo genoma viral encapsidado pela proteína N e 10 a 20 cópias da RNA polimerase dependente de RNA (van Poelwijk *et al.*, 1993). O genoma dos tospovírus é formado por três RNAs de fita simples denominados RNAs L (senso negativo), que sintetiza a polimerase dependente de RNA; M (ambisenso), que sintetiza as proteínas NSm (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) e precursores de Gc e Gn; e S (ambisenso), que sintetiza a proteína NSs (supressora do silenciamento gênico) e a proteína N que forma o nucleocapsídeo viral e é envolvida na regulação da transcrição/replicação (de Ávila, 1993; Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003; Snippe *et al.*, 2007). As extremidades dos três RNAs são

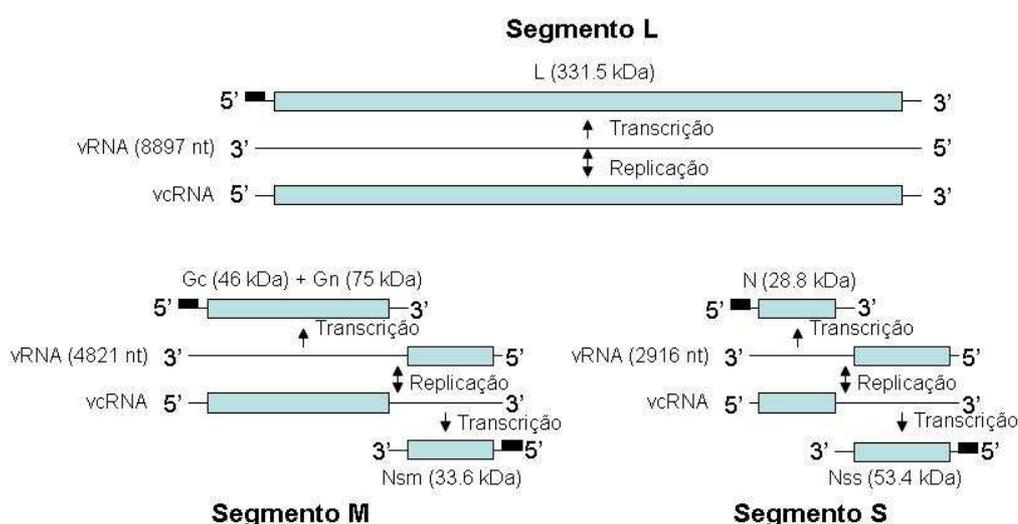
complementares entre si, formando uma estrutura pseudo-circular mais estável denominada “cabo de panela” (de Haan *et al.*, 1989) (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da partícula de um tospovírus. A membrana lipídica contém as glicoproteínas (Gn e Gc). As três estruturas localizadas na parte interna correspondem às ribonucleoproteínas (RNPs), formadas por RNA viral encapsidado pela proteína N e a polimerase (L) (adaptada de Hogenhout *et al.*, 2008).

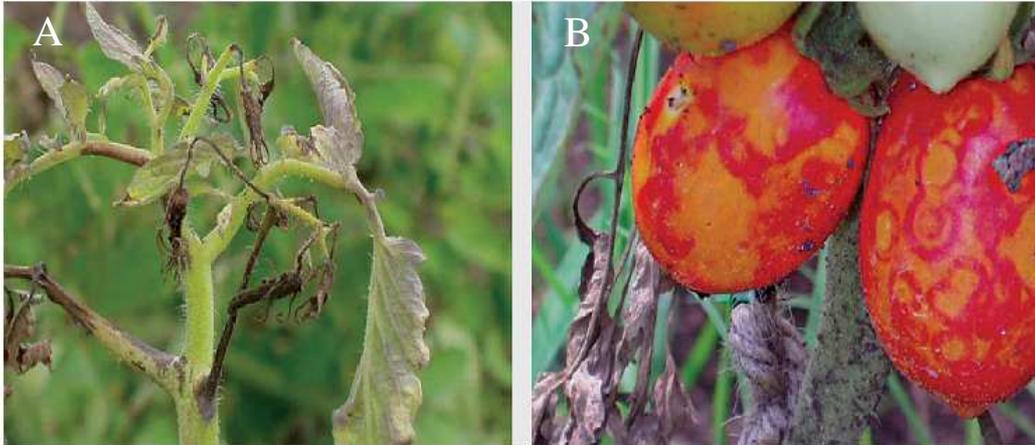
As proteínas codificadas pelos RNAs M e S são traduzidas à partir de RNAs subgenômicos. Isso significa que, antes da tradução, devem ocorrer a transcrição e o processamento de mRNAs. Para que esse processamento ocorra, o vírus recorre ao *cap-snatching*, que consiste na remoção de pequenas sequências dos mRNAs da hospedeira (*caps*), de aproximadamente 12 a 18 nucleotídeos, que correspondem ao sítio de ligação dos ribossomos. Essas sequências são em seguida incorporadas aos mRNAs virais, comprometendo grandemente a tradução dos RNAs da hospedeira (Kormelink *et al.*, 1992) (Figura 2). Após a entrada nas células, as partículas perdem o envelope lipídico, possivelmente pela ação de enzimas presentes nos lisossomos, desagregando-se assim o nucleocapsídeo. A polimerase viral então transcreve os RNAs genômicos, sintetizando-se os RNAs mensageiros. Após o processo de *cap-snatching*, os mRNAs são traduzidos, originando-se as proteínas estruturais e não-estruturais que são posteriormente envelopadas no retículo endoplasmático e complexo de golgi.

Essas partículas podem ser adquiridas ou transmitidas pelos vetores, enquanto novos nucleocapsídeos se deslocam para células adjacentes através de estruturas tubulares nos plasmodesmas originários da ação da proteína Nsm (Storms *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Estratégia de expressão do genoma de tospovírus. **vRNA** = RNA sentido viral; **vcRNA** = RNA sentido complementar; **L** = polimerase viral; **Gc** e **Gn** = glicoproteínas; **N** = proteína do nucleocapsídeo; **Nsm** = proteína de movimento; **Nss** = proteína não-estrutural. Os segmentos destacados na região 5' de cada transcrito representam a sequência *cap* adquirida durante o processo de *cap-snatching*.

Plantas suscetíveis podem apresentar manchas cloróticas em folhas, murchas, necroses de tecido, anéis cloróticos e necróticos em frutos, necrose apical, necrose generalizada e/ou bronzeamento (Figura 3). Infecções ocorridas prematuramente em cultivares altamente suscetíveis podem levar ao decaimento completo e morte da planta. Durante os períodos mais quentes e secos do ano, perdas de maior amplitude são observadas devido a maior dispersão e multiplicação dos vetores (Lopes & de Ávila, 2005). Em locais de clima ameno, o dano causado por tospovírus normalmente se restringe a casas de vegetação (Soler *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Sintomas típicos de infecção por tospovírus em plantas de tomateiro. **(A)** Sintomas avançados em folhas, pecíolos e hastes. **(B)** Sintomas em frutos (Fonte: Saidi & Warade, 2008).

O genoma dos tospovírus é muito sujeito a mutações devido a sua constituição genética ser baseada em três segmentos de RNA. Como este não possui um mecanismo de reparo (*proof reading*) durante a replicação viral, os índices de mutação são elevados (Roossinck, 1997). Dessa forma, o surgimento de isolados capazes de suplantar genes de resistência estabelecidos é relativamente comum (Herrero *et al.*, 2000). Em 2003, Aramburu *et al.* reportaram a ocorrência de um novo isolado de TSWV capaz de quebrar a resistência de plantas de tomate contendo o gene *Sw-5* no nordeste da Espanha. Fato esse confirmado em 2005, por Ciuffo *et al.* que relataram a ocorrência de isolado similar em regiões produtoras de tomate na Itália. O isolado espanhol, denominado GRAU, é o primeiro isolado de TSWV capaz de quebrar a resistência conferida por *Sw-5* e, aparentemente, se estabelecer nas áreas de cultivo. Outro isolado, conhecido como JF1, já havia sido identificado infectando plantas que possuíam o gene *Sw-5* (Thompson & van Zijl, 1996), mas este não apresentou capacidade de disseminação para outras áreas de cultivo além do campo de origem.

## 2.1. Resistência mediada pelo gene Sw-5 em tomate

Devido à importância econômica das perdas causadas por tospovírus, a resistência genética tem sido o foco das pesquisas voltadas ao manejo dessas viroses. Os primeiros estudos voltados à resistência a TSWV demonstraram a existência de cinco genes de duas espécies de *Solanum*: *Solanum pimpinellifolium* (Samuel *et al.*, 1930) e *S. lycopersicum* (Holmes, 1948). Dois genes dominantes foram denominados Sw-1<sup>a</sup> e Sw-1<sup>b</sup> e três genes recessivos foram denominados sw-2, sw-3 e sw-4 (Finlay, 1953). Em todos os casos, a resistência a tospovírus conferida por esses genes foi rapidamente superada e nenhum outro trabalho foi desenvolvido posteriormente. O gene Sw-5, primeiramente identificado em *S. peruvianum*, demonstrou ser mais estável e menos isolado-específico, conferindo resistência ampla a todos os tospovírus que infectam tomate (Stevens *et al.*, 1992; Roselló *et al.*, 1998).

Em 1988, introduziu-se nas áreas de plantio de tomate a cultivar Stevens, derivada de cruzamentos com *S. peruvianum*, contendo o gene Sw-5 conferindo resistência ampla a tospovírus (Boiteux *et al.*, 1993). Plantas que expressam o gene Sw-5 restringem a infecção sistêmica do vírus e as folhas inoculadas apresentam somente sintomas localizados, como lesões locais, causadas por reação de hipersensibilidade no sítio de inoculação, características de resistência conferida por genes dominantes (Brommonschenkel *et al.*, 2000). O gene Sw-5 pertence à mesma classe de genes de resistência do gene *Mi*, que confere resistência à *Meloidogyne* spp.; do gene *I2*, que confere resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; do gene *RPM1*, que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* em *Arabidopsis* sp. e vários outros. Essa classe de genes de resistência é denominada NBS-LRR, família de genes que contêm regiões ricas no aminoácido leucina e sítios altamente conservados de ligação de nucleotídeos (Spassova *et al.*, 2001; Brommonschenkel *et al.*, 2000) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Classes de genes R caracterizados em várias espécies vegetais contendo estruturas conservadas entre eles (adaptada de Hulbert *et al.*, 2001).

Classe/Gene	Interação (Hospedeira/Patógeno)	Estrutura da proteína
<b>1</b> <i>L</i>	Linho/ <i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR*
<i>M</i>	Linho/ <i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR
<i>N</i>	Tabaco/TMV	TIR-NBS-LRR
<i>P</i>	Linho/ <i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR
<i>RPP1</i>	<i>Arabidopsis/Peronospora</i>	TIR-NBS-LRR
<i>RPP5</i>	<i>Arabidopsis/Peronospora</i>	TIR-NBS-LRR
<i>RPS4</i>	<i>Arabidopsis/Peronospora</i>	TIR-NBS-LRR
<i>Bs2</i>	Pimenta/ <i>Xanthomonas</i>	NBS-LRR
<i>Dm3</i>	Alface/ <i>Bremia</i>	NBS-LRR
<i>Gpa2/Rx1</i>	Batata/ <i>Globodera</i>	NBS-LRR
	Batata/PVX ( <i>Rx1</i> )	
<i>I2</i>	Tomate/ <i>Fusarium</i>	NBS-LRR
<i>Mi</i>	Tomate/ <i>Meloidogyne/Macrosiphum</i>	NBS-LRR
<i>Mla</i>	Cevada/ <i>Blumeria</i>	NBS-LRR
<i>Pib</i>	Arroz/ <i>Magnaporthe</i>	NBS-LRR
<i>Pi-ta</i>	Arroz/ <i>Magnaporthe</i>	NBS-LRR
<i>Prf</i>	Tomate/ <i>Pseudomonas</i>	NBS-LRR
<i>Rp1</i>	Milho/ <i>Puccinia</i>	NBS-LRR
<i>RPM1</i>	<i>Arabidopsis/Pseudomonas</i>	NBS-LRR
<i>RPP8/HRT</i>	<i>Arabidopsis/Peronospora</i>	NBS-LRR
	<i>Arabidopsis/TCV (HRT)</i>	
<i>RPP13</i>	<i>Arabidopsis/Peronospora</i>	NBS-LRR
<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis/Pseudomonas</i>	NBS-LRR
<i>RPS5</i>	<i>Arabidopsis/Pseudomonas</i>	NBS-LRR
<i>Rx2</i>	Batata/PVX	NBS-LRR
<i>Sw-5</i>	Tomate/ <i>Tospovirus</i>	NBS-LRR
<i>Xa1</i>	Arroz/ <i>Xanthomonas</i>	NBS-LRR
<b>2</b> <i>Cf-2/5</i>	Tomate/ <i>Cladosporium</i>	LRR-TM*
<i>Cf-4/9</i>	Tomate/ <i>Cladosporium</i>	LRR-TM
<b>3</b> <i>Pto</i>	Tomate/ <i>Pseudomonas</i>	Proteína quinase
<b>4</b> <i>Xa21</i>	Arroz/ <i>Xanthomonas</i>	LRR-TM-quinase
<b>5</b> <i>HS1<sup>pro-1</sup></i>	Beterraba/ <i>Heterodera</i>	Única
<b>6</b> <i>RPW8</i>	<i>Arabidopsis/Erisyphe</i>	Única

7	<i>Mlo</i>	Cevada/ <i>Blumeria</i>	Proteína de membrana
8	<i>Hm1</i>	Milho/ <i>Cochliobolus</i>	Toxina reductase

---

\* NBS = sítio de ligação de nucleotídeos (*nucleotide binding site*); LRR = repetições ricas em leucina (*leucine-rich repeats*); TIR = domínio homólogo ao gene *Toll* de *Drosophila* e o receptor *Interleucina-1* de mamíferos; TM = domínio transmembrana (*transmembrane domain*). Os domínios são listados à medida que surgem na proteína no sentido N a C terminal.

*Solanum peruvianum* é considerado a melhor fonte de resistência à tospovírus e vários acessos foram considerados resistentes ou imunes (Paterson *et al.*, 1989). Stevens *et al.* (1994) reportaram 8 acessos de *S. peruvianum* com alta proporção de plantas resistentes contra 3 isolados de TSWV. Roselló *et al.* (1999) encontraram altos níveis de resistência em seis acessos de *S. peruvianum*: PI-126935, PI-126944, CIAPAN-16, CIAPAN-17 e PE-18. Todos os acessos apresentaram reações de hipersensibilidade.

O gene *Sw-5*, mapeado no cromossomo 9, tem sido usado amplamente no desenvolvimento de variedades de tomate híbridos. Esse uso tem levado a uma queda considerável nas perdas econômicas causadas pelos tospovírus. Apesar disso, essa resistência pode ser sobrepujada por alta pressão de inóculo ou ampla variação de temperatura (amplitude térmica) (de Ávila *et al.*, 1993; Diez *et al.*, 1995; Roselló *et al.*, 1997; Roselló *et al.*, 1998).

A resistência conferida pelo gene *Sw-5* não pode mais ser considerada uma fonte durável de resistência. Cho *et al.* (1996) reportaram que certos isolados conseguiram quebrar essa resistência, assim como, os reportados por Latham & Jones (1998) que foram selecionados a partir de populações silvestres. Aramburu *et al.* (2002) detectaram um isolado, denominado GRAU, que pode quebrar a resistência conferida por *Sw-5* em áreas de plantio da Espanha. O surgimento de diferentes isolados capazes de superar o gene de resistência *Sw-5* em várias partes do mundo onde se cultiva o tomate representa uma ameaça para a exploração dessa hortaliça,

principalmente em áreas onde os cultivos se difundiram graças ao uso de variedades que expressam este gene.

A interação entre o gene *Sw-5* e os tospovírus no tomateiro pode ser considerada como uma interação gene-a-gene, apesar de ainda não ter sido identificado o gene responsável pela ativação do sistema de reconhecimento.

### **2.3. Teoria gene-a-gene na interação patógeno/hospedeiro**

Os trabalhos de Flor (1971) introduziram os conceitos da teoria gene-a-gene que, por definição, baseia-se na ocorrência de genes de resistência (R) em hospedeiros e elicitores - ou componentes - de avirulência (Avr) em patógenos, gerando reações de hipersensibilidade que representam uma das possíveis interações negativas em um patossistema. Em relação à interação entre vírus e plantas, genes que codificam a replicase, proteína de movimento e a proteína do capsídeo já foram identificados como genes *Avr* (Weber *et al.*, 1993; Whitham *et al.*, 1994; Bendahmane *et al.*, 1995; Gilardi *et al.*, 1998; Brommonschenkel *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001; Spassova *et al.*, 2001; Lovato *et al.*, 2008). Heath (1987; 1991) postulou que uma interação gene-a-gene evoluiu como uma resposta à pressão de seleção sobre o hospedeiro após o estabelecimento de compatibilidade básica através da produção de fatores de patogenicidade pelo patógeno em questão. Essa pressão resulta na evolução de resistência baseada em hipersensibilidade que é ativada por um produto do gene de avirulência depois da interação com um receptor derivado de um gene R.

O mecanismo que explica mais precisamente as interações gene-a-gene se baseia no reconhecimento do gene *Avr* do patógeno por produtos do gene *R* através da interação direta com a proteína derivada daquele gene, ou pela interação com algum outro componente originário do mesmo (Staskawicz *et al.*, 1995). Para superar este mecanismo de reconhecimento, pequenas alterações em aminoácidos que compõem esses genes virais, mas que não chegam a afetar significativamente o mecanismo de patogenicidade, podem ocorrer. Essa quebra da resistência caracterizada por esse mecanismo de reconhecimento já foi comprovada em diversos cultivos de

grande importância econômica e a caracterização e o mapeamento de novos genes *R*, principalmente para espécies cultivadas de Solanáceas, foi realizado de maneira extensiva (Grube *et al.*, 2000; Gebhardt *et al.*, 2001).

A maioria da resistência amplamente utilizada em um contexto mundial referente aos plantios comerciais é dominante e geralmente monogênica e grande parte deste grupo, que chegou a ser caracterizado molecularmente, confere resistência a bactérias ou fungos (Hammond-Kosack & Parker, 2003). Essa resistência é caracterizada pela ocorrência constante de reação de hipersensibilidade (HR) no sítio de entrada do patógeno macroscopicamente observada como o surgimento de lesões locais necróticas seguida de abscisão foliar. As células mortas no sítio de infecção podem restringir o movimento do patógeno ou servem como reservatório de compostos antimicrobianos como fitoalexinas sintetizadas por células que circundam a lesão. Ocorre também a deposição de calose, lignina, glicoproteínas e o acúmulo de outras proteínas relacionadas com a patogênese, como 1,3- $\beta$ -glucanases e quitinases, resultando na limitação da movimentação a curta e a longa distância por parte do vírus (Collinge & Slusarenko, 1987; Keppler & Baker, 1989; Bol *et al.*, 1990; Bostock & Stermer, 1990). Xie & Chen (2000) afirmaram que as reações de hipersensibilidade ativadas por uma reação incompatível entre patógeno e hospedeiro têm características comuns aos processos apoptóticos em células animais. Algumas reações como a fosforilação protéica e geração de ROS (*reactive oxygen species*), que ocorrem em células animais em processos de apoptose foram verificados em reações de hipersensibilidade em plantas (Apel & Hirt, 2004). As ROS possuem atividade antimicrobiana e são capazes de reduzir a viabilidade do patógeno (Greenberg & Yao, 2004).

Na última década, vários genes de resistência e seus correspondentes de avirulência virais foram clonados, por exemplo, os genes *RTM1/RTM2* e *HRT* em *Arabidopsis*, que conferem resistência a *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Turnip crinckle virus* (TCV), respectivamente (Cooley *et al.*, 2000) e os genes *Tm22* e *Sw-5* em tomate, que conferem resistência a *Tomato mosaic virus* (ToMV) e TSWV, respectivamente (Weber *et al.*, 1993; Brommonschenkel *et al.* 2000, Spassova *et al.*, 2001).

Pesquisas que visam compreender a interação entre genes de resistência a TSWV e seu componente de avirulência foram realizados anteriormente em alguns membros dessa classe de genes como *Sw-5* e *Tsw*, originário de *Capsicum chinense* e que também apresenta reação de hipersensibilidade a infecção por tospovírus (Hoffmann *et al.*, 2001; Margaria *et al.*, 2007; Lovato *et al.*, 2008). No caso do gene *Tsw*, a expressão do gene de avirulência parece estar localizada no componente S, que contém os genes NSs, que sintetiza uma proteína não estrutural e que está envolvida com a supressão do silenciamento gênico e N, que sintetiza a proteína do capsídeo (de Ávila, 1993; Lovato *et al.*, 2008). Para o gene *Sw-5*, Hoffmann *et al.* (2001) verificou, através do uso de isolados recombinantes, que o gene de avirulência desta interação está localizado no componente M, que contém o gene NSm, que sintetiza a proteína de movimento; e o precursor das glicoproteínas Gc e Gn que recobrem o envelope lipídico e são responsáveis pela interação tospovírus/inseto vetor (Bandla *et al.*, 1998).

A compreensão dessas interações pode levar ao desenvolvimento de novas fontes de resistência, algo considerado de extrema importância e premente, pois a ocorrência de isolados capazes de suprimir sua função já foram confirmadas em cultivos de tomate em diferentes países (Thompson & Van Zijl, 1996; Aramburu & Marti, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005;). Além disso, podem contribuir para o entendimento dos processos de geração dos isolados capazes de superar essa resistência no campo. A capacidade de multiplicação no inseto vetor e a composição de seu genoma tripartido podem potencialmente conferir aos vírus da família *Bunyaviridae* a geração de novos isolados, a partir de eventos de recombinação (*reassortment*) de segmentos inteiros de seu genoma (Ullman *et al.*, 1993; Wijkamp *et al.* 1993). Considerando esse potencial de adaptação, a possível manipulação da resistência para a criação de alternativas duráveis e específicas depende essencialmente do entendimento das interações patógeno/hospedeira.

Para a observação dessas interações, novas ferramentas devem ser desenvolvidas. Lau *et al.* (2006) testaram a capacidade de reconhecimento de fatores do patógeno em plantas de tabaco selvagem da espécie *Nicotiana benthamiana* transformadas com o gene *Sw-5*. Esse modelo biológico mostrou-se funcional, apresentando o mesmo espectro de resistência do

locus *Sw-5* em tomate com reações de hipersensibilidade que contiveram os inóculos de TCSV, GRSV e CSNV (de forma variável) nos sítios de infecção, apesar de ter se verificado a existência de polimorfismos que podem ter levado a diferentes níveis de resistência. Spassova *et al.* (2001) demonstraram a eficiência da plataforma transgênica baseada em *Sw-5* ao transformar plantas de *Nicotiana tabacum* com este locus. A partir dessa plataforma, foi possível demonstrar que a cópia *Sw-5b* do locus era suficiente para conferir resistência a tospovírus e que *Sw-5a* parece contribuir para o aumento do grau de resistência, apesar de não ser em uma intensidade significativa.

Outro gênero de vírus de grande importância para o tomateiro é o *Potyvirus*, do qual faz parte uma nova espécie identificada em 2002, comprovadamente importante em plantios de tomate, principalmente na região serrana do Espírito Santo.

### **3. *Pepper yellow mosaic virus***

Os potyvírus são considerados o maior e mais importante gênero de vírus de plantas, com 20% das espécies conhecidas, apresentando aproximadamente 200 espécies – 110 definitivas e 86 prováveis espécies novas (Hull, 2002; Fauquet *et al.*, 2005) e são capazes de infectar mais de 2.000 espécies de plantas (Berger *et al.*, 2005). O potencial de dano desses vírus é considerado extremamente alto para a agricultura tornando a busca por resistência a esses vírus essencial para o manejo das culturas suscetíveis a esses patógenos (Shukla *et al.*, 1988; Fauquet *et al.*, 2005). O *Potato virus Y* (PVY), a espécie tipo, é um vírus de grande importância na cultura do pimentão e da pimenta e desde a década de 60 é considerado fator limitante da produção no Brasil (Nagai, 1968). No início da década de 70, a introdução de cultivares resistentes causou a diminuição da importância deste vírus, apesar dessa resistência ser quebrada com frequência por novos isolados (Nagai, 1983). O uso intenso dessas cultivares levou a seleção e emergência de isolados virulentos considerados variantes de PVY capazes de suplantarem esta resistência, como o PVY<sup>m</sup>, no início da década de 90. Essa

estirpe, denominada dessa forma por infectar pimentões da cultivar ‘Magda’, emergiu como nova ameaça a plantios que apresentavam resistência a PVY (Nagai, 1993) (Figura 4). Análises baseadas em ELISA direto e do genoma correspondente à região 3’ UTR e da capa protéica, caracterizaram este isolado como sendo uma nova espécie de potyvírus por apresentar baixa relação filogenética com isolados típicos de PVY. Essa nova espécie, denominada *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Inoue-Nagata *et al.*, 2002), foi identificada também afetando cultivos de tomate causando perdas de até 100%, como relatado em regiões produtoras do Espírito Santo, mais especificamente em plantios da cultivar Alambra (de Ávila *et al.*, 2004; Maciel-Zambolim *et al.*, 2004). Existem diferenças biológicas e genômicas entre isolados de PepYMV de pimentão e de tomate, que vão desde a gama de hospedeiros até intensidade de sintomas e variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos do gene da capa protéica (Cunha *et al.*, 2004). Atualmente esses isolados são causadores de sérios problemas, tanto em plantios de tomate quanto de pimentão (Inoue-Nagata *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Planta de pimenta (*Capsicum* sp.) apresentando sintomas intensos de infecção por PepYMV.

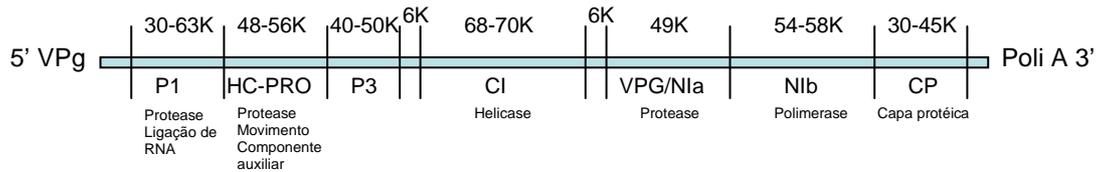
Alguns levantamentos demonstraram que o PepYMV está se distribuindo por importantes regiões produtoras de hortaliças no país. Em levantamento realizado por Palazzo *et al.* (2004), 23% de plantas com sintomas de viroses apresentaram infecção por PepYMV. Levantamentos em

outros estados, como Minas Gerais (Ferreira *et al.*, 2005) e no Distrito Federal (Dianese *et al.*, 2008), detectaram alta incidência de PepYMV em plantios comerciais de tomate.

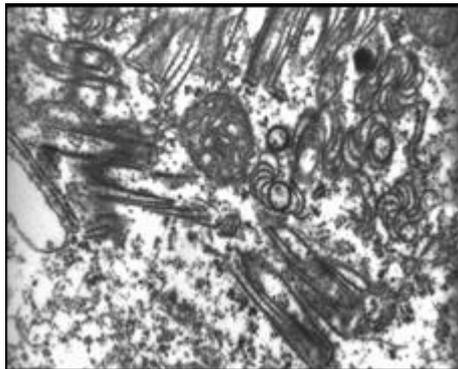
Como característico para os potyvírus (Hull, 2002), o genoma é formado por RNA fita simples senso positivo que codifica uma poliproteína de aproximadamente 10 kb, com uma proteína codificada pelo vírus (VPg) covalentemente ligada à extremidade 5' e uma calda poli-A na extremidade 3'. Apresenta uma partícula filamentosa de 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nanômetros de diâmetro, aproximadamente (Figura 5). A poliproteína é clivada pela ação de proteases produzidas pelo próprio vírus ou pelo hospedeiro. Essa clivagem resulta na liberação de sete proteínas denominadas P1, *helper component* (HC-Pro), P3, inclusão cilíndrica (CI), inclusão nuclear A (NIa), inclusão nuclear b (NIb), proteína do capsídeo (CP) e duas pequenas proteínas denominadas 6K1 e 6K2 (Riechmann *et al.*, 1992; Berger *et al.*, 2005) (Figura 6). Proteínas produzidas em excesso formam inclusões citoplasmáticas, principalmente do tipo cata-vento, graças ao acúmulo da proteína CI (Figura 7). O acúmulo destas inclusões, citoplasmáticas ou nucleares, é uma das características principais das infecções causadas por potyvírus (Zerbini & Maciel-Zambolim, 1999).



**Figura 5.** Partículas purificadas de potyvírus (Fonte: <http://www.dpvweb.net/intro/a1.gif> em 11/03/2009).



**Figura 6.** Mapa genômico dos potyvirus. As barras mostram os sítios de clivagem. A barra azul mostra a organização dos genes virais. Os números acima mostram o tamanho das proteínas codificadas por cada gene. Abaixo da linha, os nomes das proteínas estruturais e a função de cada uma.



**Figura 7.** Inclusões em cata-vento formadas a partir do acúmulo de proteínas de potyvirus em células infectadas (Fonte: [http://mcb.web.psi.ch/teaching/Virology/PlantsPoeggeler\\_05\\_files/slide0055\\_image071.jpg](http://mcb.web.psi.ch/teaching/Virology/PlantsPoeggeler_05_files/slide0055_image071.jpg) em 11/03/2009).

As proteínas CI, NlB, NlA, 6K2, P1, HC e P3 estão relacionadas com a replicação viral. A proteína do capsídeo (CP) juntamente com HC-Pro estão intimamente ligadas ao processo de movimentação viral célula-a-célula e a longa distância e, ainda, a transmissão por afídeos (Revers *et al.*, 1999).

Plantas suscetíveis apresentam mosaico severo e deformação foliar, sendo que, em plantas tolerantes é comum o desenvolvimento de mosaico leve e amarelecimento de folhas novas. Os frutos não apresentam sintomas, mas se tornam pouco desenvolvidos (Lopes & de Ávila, 2005). Em tomate, as folhas apresentam mosqueado leve, até um mosaico forte que toma a superfície foliar e causa grande redução na produção (Inoue-Nagata *et al.*, 2002; Maciel-Zambolim *et al.*, 2004). Sintomas em plantas indicadoras são bastante similares àqueles causados por PVY. Para se diferenciar isolados de PVY e PepYMV, recomenda-se o uso de *Datura metel*. Essa indicadora apresentará clareamento de nervuras, mosqueado e deformação foliar

quando infectada por PVY; e pontos necróticos que podem evoluir até a morte da planta quando infectada por PepYMV (Inoue-Nagata & Resende, 2008).

Este vírus é transmitido de maneira não-persistente por afídeos, se depositando no estile dos vetores (Hull, 2002) (Figura 8). Desse modo, pode ser transmitido rapidamente após a aquisição. Por essa razão, o controle através da erradicação de vetores é considerado bastante ineficiente (Nagai, 1993). O uso de defensivos agrícolas acaba por estimular o número de picadas de prova do inseto, aumentando assim a eficiência da transmissão (Berger *et al.*, 2005). Devido à ocorrência constante de infecções mistas no campo, a análise através de sorologia ou o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para detecção deste novo vírus se vêem necessárias. A simples análise de sintomas para se identificar infecções por PepYMV não são consideradas suficientes, pois os sintomas apresentados por plantas infectadas por esse vírus se confundem aqueles que surgem devido à infecções por begomovírus (Dianese *et al.*, 2008).



**Figura 8.** Afídeos na face inferior de uma folha de tomateiro (Fonte: <http://www.ces.ncsu.edu/chatham/ag/SustAg/GSFgraphics/aphids.jpg> em 11/03/ 2009).

Até o momento não foram identificadas fontes de resistência em tomate para o PepYMV. Alguns levantamentos preliminares buscando identificar acessos resistentes ao vírus já foram realizados (Juhász *et al.*, 2006), porém, sem conclusões definitivas, apontando como possível fonte de resistência acessos selvagens da espécie *Solanum habrochaites*.

### 3.1 Resistência recessiva envolvida na interação potyvírus/hospedeira

Pelo fato deste vírus ser transmitido de maneira não-persistente e não-circulativa, o manejo da doença através de pulverizações de defensivos visando a eliminação do vetor não resultam em efeitos positivos (Berger *et al.*, 2005). O uso de resistência genética torna-se a única alternativa significativa, apesar de que métodos preventivos como uso de mudas sadias e alocação de plantios longe de lavouras com plantas velhas de pimentão ou tomate podem evitar grandes perdas (Lopes & de Ávila, 2005).

A maioria dos genes de resistência disponíveis para melhoramento genético do tomateiro são originários de espécies silvestres desse gênero (Doganlar *et al.*, 1997). A espécie de tomateiro selvagem *Solanum peruvianum* é considerada uma das mais importantes doadoras de genes de resistência e de caracteres agrônômicos e nutricionais (Stevens *et al.*, 1992). *Solanum habrochaites* (antigo *Lycopersicon hirsutum*) também fornece genes de resistência, mas, diferentemente do que é fornecida por *S. peruvianum*, é do tipo recessiva (Parrella *et al.*, 2002). Vários genes que conferem esse tipo de resistência contra viroses já foram identificados (Tabela 4), demonstrando que para esses patógenos a resistência recessiva parece ser extremamente comum (Fraser, 1990).

**Tabela 4.** Genes recessivos de resistência a vírus vegetais encontrados em acessos de plantas cultivadas e selvagens (modificado de Maule *et al.*, 2007).

	Vírus	Espécie Vegetal	Referências
<b>Genes Naturais</b>			
<i>pvr1, pvr2<sup>1</sup>, pvr2<sup>2</sup> + pvr6</i>	PVY, Tobacco etch virus (TEV), Potato vein mottling virus (PVMV)	Pimenta ( <i>Capsicum</i> spp.)	Ruffel <i>et al.</i> , 2002; 2006 Kang <i>et al.</i> , 2005
<i>pot-1</i>	Pea seed borne mosaic virus (PSbMV)	Tomate ( <i>Solanum</i> spp.)	Ruffel <i>et al.</i> , 2005
<i>sbm1</i>	Lettuce mosaic virus (LMV)	Ervilha ( <i>Pisum sativum</i> )	Gao <i>et al.</i> , 2004
<i>mo1<sup>1</sup>, mo1<sup>2</sup></i>	Barley mild mosaic virus (BaMMV),	Alface ( <i>Lactuca sativa</i> )	Nicaise <i>et al.</i> , 2003
<i>rym4/5</i>	Barley yellow mosaic virus (BaYMV), Barley yellow mosaic virus 2 (BaYMV-II)	Cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	Stein <i>et al.</i> , 2005; Kanyuka <i>et al.</i> , 2005
<i>rymv1</i>	Rice yellow mottle virus (RYMV)	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Albar <i>et al.</i> , 2006
<i>nsv</i>	Melon necrotic spot virus (MNSV)	Melão ( <i>Cucumis melo</i> )	Nieto <i>et al.</i> , 2006
<b>Mutantes</b>			
<i>eIF4E1</i>	Clover yellow vein virus (CYVV)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sato <i>et al.</i> , 2005
<i>eIF(iso)4E</i>	Turnip mosaic virus (TuMV), LMV, TEV	<i>A. thaliana</i>	Duprat <i>et al.</i> , 2002 ; Lellis <i>et al.</i> , 2002
<i>eIF4E (cum1)</i>	CMV	<i>A. thaliana</i>	Yoshii <i>et al.</i> , 2004
<i>eIF4G (cum2)</i>	CMV, Tobacco mosaic virus (TMV)	<i>A. thaliana</i>	Yoshii <i>et al.</i> , 2004

Duas hipóteses são levantadas quando se analisa a resistência fornecida por genes recessivos: a primeira aborda a possibilidade de que a resistência seja passiva, a partir da falta ou da mutação de um fator do hospedeiro, necessário para a complementação do ciclo de infecção; a segunda se baseia em uma resistência ativa, capaz de produzir um inibidor ou algum fator que reconhece moléculas produzidas pelo vírus (Fraser, 1990; Diaz-Pendon *et al.*, 2004; Robaglia & Caranta, 2006).

Os vírus são diretamente dependentes de fatores do hospedeiro para que sejam capazes de completar o ciclo de infecção. Estudos desses fatores levaram a identificação de mutações de componentes do chamado complexo eucariótico de iniciação da tradução (eIF4E e eIF4G) capazes de conferir resistência a vírus de RNA (Diaz-Pendon *et al.*, 2004; Robaglia & Caranta, 2006). Foi verificada a interação direta desse fator com a proteína VPg de PVY (Kang *et al.*, 2005). A confirmação da participação destes fatores no desenvolvimento de resistência não é inesperado, pois todos os vírus precisam ser traduzidos para que o processo infectivo se inicie. Apesar disso, a interferência de eIF4E na movimentação do vírus observada por Gao *et al.* (2004), acabou por levantar dúvidas quanto à função do fator de iniciação

durante a infecção viral. Ainda não se sabe ao certo se este fator de iniciação age unicamente sobre a tradução do RNA no início do ciclo de infecção, ou se possui uma função chave em outras fases deste ciclo.

### **Escopo e objetivos da presente tese**

Considerando o estudo desses dois modelos de interação patógeno/hospedeira descritos acima, o presente trabalho teve como objetivo geral aprofundar o conhecimento científico em relação a fontes de resistência a *Pepper yellow mosaic virus* e às espécies de tospovírus que agem nos neotrópicos infectando tomates, bem como desenvolver um novo marcador para uso em melhoramento de tomateiros baseado no gene *Sw-5* e a análise de mecanismos da interação patógeno/hospedeira.

## OBJETIVOS

- 1) Buscar novas fontes de resistência a *Tospovirus* e *Pepper yellow mosaic virus* a partir do banco de germoplasma de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) da Embrapa Hortaliças
- 2) Analisar a presença do gene *Sw-5* em diferentes acessos cultivados e selvagens de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) a partir do desenvolvimento de um marcador específico para este gene
- 3) Analisar a interação TSWV/*Sw-5* através do estudo do componente de avirulência desta interação e componentes virais envolvidos na superação da resistência regida pelo gene *Sw-5*

## **Capítulo 2**

### **Identificação de fontes de resistência múltipla a *Pepper yellow mosaic virus* e a *Potato virus Y* em acessos de espécies selvagens de *Solanum* (secção *Lycopersicon*)\***

\*Parte deste capítulo foi publicada em uma versão modificada como:

DIANESE, E.C., RESENDE, R.O. & INOUE-NAGATA, A.K. Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. *Tropical Plant Pathology* 33:67-68. 2008.

## 1) INTRODUÇÃO

A família *Potyviridae* é considerada como um dos maiores grupos de vírus que afetam plantas pelo mundo, englobando 20% de todas as espécies virais conhecidas infectando plantas. O gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*) possui aproximadamente 200 espécies, incluindo-se 110 definitivas e 86 prováveis espécies novas (Fauquet *et al.*, 2005). O genoma dos membros da família *Potyviridae* tem aproximadamente 10 kb, sendo formado por um ssRNA senso positivo, com uma proteína codificada pelo vírus (VPg) covalentemente ligada à extremidade 5' e uma calda de poli-A na extremidade 3'. Apresenta cerca de 680 a 900 nanômetros de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro. É traduzido como uma poliproteína que é clivada em polipeptídeos menores a partir de proteases produzidas pelo próprio vírus ou pelo hospedeiro. O resultado desta clivagem é a liberação de sete proteínas menores denominadas P1, helper component (HC), P3, inclusão cilíndrica (CI), inclusão nuclear A (NIa), inclusão nuclear b (NIb), proteína do capsídeo (CP) e duas pequenas proteínas restantes denominadas 6K1 e 6K2 (Riechmann *et al.*, 1992). O vírus denominado *Potato virus Y* (PVY) é a espécie tipo deste gênero, sendo capaz de infectar diversas solanáceas de importância econômica incluindo batata, tomate e pimentão. O potencial de dano desse grupo é considerado extremamente elevado para a agricultura e a busca por resistência é essencial para o manejo das culturas suscetíveis a esses patógenos (Shukla *et al.*, 1988; Fauquet *et al.*, 2005).

Os potyvírus são transmitidos por afídeos de maneira não-circulativa, se depositando no estilete dos vetores. Desse modo, pode ser transmitido em apenas alguns segundos após a aquisição em uma hospedeira infectada. Por essa razão, o controle através da erradicação dos vetores se demonstra bastante ineficiente (Nagai, 1993). Neste contexto, a principal estratégia de controle tem sido o emprego de cultivares de batata, tomate e pimentão com resistência genética (Nagai, 1993; Boiteux *et al.*, 1996).

No Brasil, desde a década de 1960, as infecções por PVY têm sido consideradas como o principal fator limitante na produção, principalmente de pimentão (Nagai *et al.*, 1968). No entanto, o cultivo do tomateiro também era afetado por PVY, causando sintomas de “risca”, mosaico e, para alguns

isolados, a indução de necrose de ápice ou “pinheirinho”. As epidemias de PVY eram mais freqüentes em regiões do Estado de São Paulo onde haviam cultivos simultâneos de pimentão e tomate (Nagai, 1993). Por esta razão o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) iniciou um programa de melhoramento de cultivares do tipo “Santa Cruz” visando incorporar resistência ao “mosaico do tomateiro” ou “risca do tomateiro”, causada por isolados de PVY (Nagai, 1993). A primeira cultivar de importância liberada pelo IAC (em 1969) foi ‘Ângela’ (resultante do cruzamento interspecífico entre ‘Santa Cruz’ x *S. pimpinellifolium* ‘PI 126410’) que combinava resistência a “risca do tomateiro”, a murcha de *Fusarium* raça 1 (gene *I-1*), mancha de *Stemphylium* e tolerância a podridão apical dos frutos (Nagai, 1993).

No início da década de 90, um novo isolado de PVY (denominado PVY<sup>m</sup> por infectar pimentões das variedade ‘Magda’) surgiu como uma nova ameaça aos plantios de pimentão que originalmente apresentava resistência a potyvírus (Nagai, 1993). Análises baseadas em ELISA direto indicaram que o isolado PVY<sup>m</sup> tinha pouca ou nenhuma relação com isolados típicos de PVY. Verificações adicionais através de análise da seqüência do genoma correspondente a região 3’ UTR e da capa protéica demonstraram que esse novo isolado representava uma nova espécie, denominada *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Inoue-Nagata *et al.*, 2002). Foi verificado posteriormente que essa espécie também infectava tomates, com registro de perdas de até 100% em plantios de tomateiro na região serrana do Espírito Santo (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004; de Ávila *et al.*, 2004).

Em tomate, PepYMV causa desde um mosqueado leve, até um mosaico forte que toma toda a superfície foliar. Pode causar grande redução na produção, mas não foram reportados sintomas em frutos (Inoue-Nagata *et al.*, 2002; Maciel-Zambolim *et al.*, 2004). Os sintomas causados em plantas indicadoras são extremamente similares aos causados por PVY. Para se realizar a diferenciação dos isolados, recomenda-se o uso de *Datura metel*, que apresenta clareamento de nervuras, mosqueado e deformação foliar quando infectado por PVY e pontos necróticos que podem evoluir até a morte da planta quando infectada por PepYMV (Inoue-Nagata & Resende, 2008).

Pelo fato deste vírus ser transmitido de maneira não-persistente e não-circulativa, manejar a doença através de pulverizações que visem eliminar o

vetor não resultam em efeitos positivos nos plantios. O uso de resistência genética torna-se a única alternativa viável e efetiva, tanto economicamente quanto ecologicamente. Fontes de resistência ao PepYMV e outras espécies de potyvírus tem sido relatadas na espécie selvagem *S. habrochaites* (= *L. hirsutum*) (Juhász *et al.*, 2006). O objetivo deste trabalho foi expandir a avaliação do germoplasma de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) em busca de fontes de resistência múltipla a PepYMV e a PVY, as duas espécies de *Potyvirus* mais importantes para o cultivo do tomateiro no Brasil.

## **2) MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1) Obtenção do isolado**

Em Agosto de 2005 foi realizada uma coleta para se verificar a presença de PepYMV e outros vírus em um dos principais pólos olerícolas do Distrito Federal, o Taquara. Dois campos de produção foram visitados com tomateiros de 30-40 dias (campo 1) e de 80-90 dias (campo 2) com vários híbridos e materiais de polinização aberta. Cinquenta e quatro amostras foliares coletadas foram analisadas através de observação de sintomas em plantas indicadoras, pela técnica de PCR para detecção de begomovírus utilizando os primers pALV1978 e pARc496 (Rojas *et al.*, 1993) e ELISA para o cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (CMV), os potyvírus *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e os tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV).

### **2.2) Seleção de genótipos resistentes**

#### **2.2.1) Preparo das mudas**

Cento e vinte acessos de tomate foram selecionados no banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças para os testes de resistência a PepYMV. Destes, somente 24 acessos eram da espécie *S. lycopersicum*

(entre híbridos e linhagens avançadas), sendo o experimento então composto, em sua maioria, por acessos selvagens. Em seguida, foram semeados em bandejas de 128 poços com substrato agrícola (Plantmax®). Cerca de 20 a 30 dias após a germinação, quando as plantas apresentavam pelo menos um par de folhas verdadeiras, as mudas foram transplantadas para vasos de 3 litros com solo autoclavado. Para a montagem do experimento foram plantadas três plantas por vaso, três vasos por acesso, sendo que um dos vasos era considerado o controle negativo.

### **2.2.2) Manutenção e preparo do inóculo**

Plantas indicadoras para o PepYMV foram polvilhadas com carborundum (400 mesh) e inoculadas mecanicamente com o isolado 4284 (Dianese *et al.*, 2008), cerca de 15 dias antes do transplante do material a ser testado. As plantas usadas para multiplicação e manutenção do inóculo viral foram: *Nicotiana rustica*, *Capsicum annuum* cv. Ikeda, *Nicotiana benthamiana* e *Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara e cv. Alambra. Folhas apresentando sintomas claros, como deformação foliar e mosaico, foram coletadas e maceradas em almofarizes previamente acondicionados no gelo, visando a preservação da infectividade do vírus até o momento da inoculação. O tampão de inoculação continha fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) 0,01 M e sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) 1% (P/V) em água destilada. A proporção de tecido vegetal/tampão usada foi de 1:10.

### **2.2.3) Inoculação**

Todos os acessos foram polvilhados com carborundum (400 mesh) e todas as folhas foram inoculadas mecanicamente com a preparação feita a partir de folhas sintomáticas das plantas suscetíveis usadas como inóculo. Em seguida, o experimento foi irrigado para se retirar o excesso de carborundum e evitar a queima das folhas. Aproximadamente 48 horas depois, foi realizada uma segunda inoculação seguindo o mesmo método. Dessa forma reduziu-se significativamente o nível de escape, como recomendado por Boiteux & de Ávila (1994).

#### 2.2.4) Purificação do vírus e preparo de anticorpos (IgG)

Partículas virais de PepYMV foram purificadas a partir de folhas infectadas seguindo-se o método descrito por Zambolim (1984) com modificações. Primeiramente, as folhas foram maceradas em tampão borato (ácido bórico 0,2 M pH 8.3, EDTA 10 mM, 0.15% de Mercapto-etanol) na proporção 1:5 em um liquidificador utilizado somente para esse propósito. Em seguida, esse extrato foi coado com gaze previamente esterilizada. Ao extrato adicionou-se 2% de Triton X-100 seguido de agitação lenta por 90 minutos. Após esse período, 6% de PEG 6000 com 0.5% de NaCl foram adicionados antes de mais 90 minutos de agitação lenta. Uma centrifugação a 10.000 g por 20 minutos se seguiu, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 20% do volume inicial de ácido bórico 50 mM pH 8.3, uréia 0.5 M, EDTA 6 mM, 0.1% de mercapto-etanol em seguida. O *pellet* foi ressuspenso nessa solução, a qual passou por mais um ciclo de centrifugação a 5.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e um ciclo de centrifugação a 45.000 RPM por 60 minutos se seguiu, descartando-se o sobrenadante logo após o término do ciclo. Ao precipitado adicionou-se ácido bórico 50 mM pH 8.3 e deixou-se ressuspenso em agitação *overnight*. Uma centrifugação a 5.000 g por 10 minutos foi realizada e 2 mL do sobrenadante foram adicionados em um gradiente isopícnico de CsCl (2 mL de CsCl por camada com as concentrações 1.3 g/mL, 1.5 g/mL e 1.7 g/mL), seguido de uma nova centrifugação a 49.000 RPM por 6 horas. A fração contendo as partículas virais (banda translúcida) foi coletada utilizando-se uma seringa, observando-se a banda através de um feixe de luz direto. Mais uma centrifugação foi realizada a 49.000 RPM por 60 minutos ao adicionar a banda coletada em uma solução de tampão borato 50 mM para concentração das partículas virais. O precipitado foi em seguida ressuspenso no mesmo tampão borato restante.

O vírus purificado foi utilizado na imunização de coelhos comuns com três a quatro meses de idade através da utilização de adjuvante completo e incompleto na proporção 1:1 (adjuvante/purificação) via injeção subcutânea.

A coleta dos anti-soros iniciou-se 28 dias após o início da imunização dos animais. O sangue foi recolhido de um pequeno corte longitudinal na veia marginal de uma das orelhas, sendo em seguida colocado a 37° C por 45 minutos e, logo depois, deixado por duas horas em geladeira. O soro foi recolhido e centrifugado a 2.000 g por 10 minutos e armazenado a -20° C. Esse procedimento foi repetido uma vez por semana, até 4 semanas.

Para a purificação do anti-soro bruto, 1 mL do mesmo foi adicionado a 9 mL de água destilada e 10 mL de sulfato de amônio saturado em um tubo de centrífuga e colocado em temperatura ambiente por 1 hora. Após um ciclo de centrifugação de 10.000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi diluído em 1 mL de ½ PBS (para 1 litro de PBS 10X adicionar: NaCl 1.4 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.08 M, KCl 0.02 M). Toda a diluição foi transferida para um tubo de diálise vedado de ambos os lados e colocada em um recipiente com 2 litros de ½ PBS a -4° C *overnight*. O IgG foi transferido para um tubo de 1,5 mL e diluído até 1,4 mg/mL, medido através do uso de um espectrofotômetro da marca Eppendorf Biophotometer. Aos tubos foi adicionada, aproximadamente, 0,01 grama de azida sódica, seguido de armazenamento em freezer a -20° C.

Para a preparação do conjugado, 2 litros de tampão ½ PBS foram preparados e tubos de diálise cortados no tamanho adequado foram fervidos em água destilada por 30 segundos para abertura dos poros. Duas mil unidades da enzima fosfatase alcalina (Sigma) foram centrifugadas a 10.000 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e 1 mL do IgG previamente purificado foi adicionado ao tubo, ressuspensando o *pellet*. Transferiu-se essa suspensão para um tubo de diálise que, em seguida, foi vedado com presilhas. Este tubo foi colocado em um becker contendo 100 mL de tampão ½ PBS, acrescentando-se a esse tampão 200 µl de glutaraldeído 25% e colocando-o em agitação leve, protegido da luz, por 4 horas a temperatura ambiente. Este tubo foi transferido para um novo becker para ser dializado três vezes em tampão ½ PBS (um litro de tampão para cada diálise). Após este procedimento, 0,01 g de azida sódica e albumina bovina, respectivamente, foram adicionadas ao conjugado antes do armazenamento em geladeira a -4° C.

#### **2.2.4) Avaliação da resistência**

Todos os acessos, incluindo-se os controles negativos, foram avaliados através de DAS-ELISA (*double antibody sandwich – Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Clark & Adams, 1977) seguindo-se o protocolo: 200 µL de IgG (1,4 µg/mL) diluído 1000 vezes em tampão de revestimento carbonato de sódio, pH 9.6. Em seguida as placas foram incubadas por uma noite a 4° C. Os próximos passos consistiram de: três lavagens com tampão PBS-TWEEN, adição de 100 µL de amostras extraídas em tampão PBS-TWEEN aos poços, incubação por 2 a 4 horas a 37° C, mais três lavagens com PBS-TWEEN seguidas da adição de 100 µL de IgG conjugado diluído (1000 vezes) em PBS-TWEEN e incubação por 2 a 4 horas a 37° C. Para se executar o processo de revelação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-TWEEN e em seguida foi adicionado 100 µL de substrato da enzima fosfatase alcalina (1µg/mL) em tampão de dietanolamina por poço e armazenadas em ambiente escuro. As leituras das placas foram feitas em leitor de ELISA Labsystem Multiscan® Bichromatic a 405 nm.

### **3) RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1) Obtenção do isolado**

Todas as 30 amostras de tomateiro coletadas no campo 1 apresentaram resultados positivos em ELISA para PepYMV. Nenhuma delas estava infectada por begomovírus, de acordo com os resultados obtidos via PCR. Das 24 amostras coletadas no campo 2, 16 foram positivas para PepYMV, 18 positivas para begomovírus e 11 apresentaram infecções mistas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação de amostras coletadas em Taquara, DF, e resultados de ELISA para potyvírus, tospovírus e cucumovírus e PCR para begomovírus. Os resultados de leitura para ELISA (em vermelho) foram considerados positivos para PepYMV (valor duas vezes maior que o obtido pelo controle negativo). O isolado 4284 foi selecionado para o uso nos testes de resistência.

Amostras	ELISA PepYMV	PCR Gemini	Dot- ELISA CMV	ELISA PVY	ELISA TSWV	ELISA TCSV	ELISA GRSV	ELISA CSNV
4258	0.016	-	-	-	-	-	-	-
4259	0.463	-	-	-	-	-	-	-
4260	0.109	-	-	-	-	-	-	-
4261	0.335	-	-	-	-	-	-	-
4262	0.280	-	-	-	-	-	-	-
4263	0.033	-	-	-	-	-	-	-
4264	0.212	-	-	-	-	-	-	-
4265	0.111	-	-	-	-	-	-	-
4266	0.147	-	-	-	-	-	-	-
4267	0.536	-	-	-	-	-	-	-
4268	0.111	-	-	-	-	-	-	-
4269	0.976	-	-	-	-	-	-	-
4270	0.043	-	-	-	-	-	-	-
4271	0.522	-	-	-	-	-	-	-
4272	0.890	-	-	-	-	-	-	-
4273	1.081	-	-	-	-	-	-	-
4274	0.295	-	-	-	-	-	-	-
4275	0.656	-	-	-	-	-	-	-
4276	1.394	-	-	+	+	-	-	-
4277	0.916	-	-	-	-	-	-	-
4278	1.321	-	+	-	-	-	-	-
4279	0.854	-	-	-	-	-	-	-
4280	0.940	-	-	-	-	-	-	-
4281	0.100	-	-	-	-	-	-	-
4282	1.438	-	-	-	-	-	-	-
4283	1.498	-	-	+	-	-	-	-
4284	1.527	-	-	-	-	-	-	-
4285	0.313	-	-	-	-	-	-	-
4286	1.586	-	+	+	-	-	-	-
4287	1.351	-	-	-	-	-	-	-
4288	1.046	-	-	-	-	-	-	-
4289	1.307	-	-	-	-	-	-	-
4290	1.429	-	-	-	-	-	-	-
4291	1.047	-	-	+	-	-	-	-
4292	1.757	-	-	-	-	-	-	-
4293	1.105	-	-	-	-	-	-	-
4294	0.124	-	-	-	-	-	-	-
4295	0.149	-	-	-	-	-	-	-
4296	1.075	-	-	-	-	-	-	-
4297	0.137	+	-	-	-	-	-	-
4298	0.043	-	-	-	-	-	-	-
4299	0.140	-	-	-	-	-	-	-
4300	0.030	+	-	-	-	-	-	-
4301	0.208	+	-	-	-	-	-	-
4302	0.199	+	-	-	-	-	-	-
4303	0.217	+	-	-	-	-	-	-
4304	0.112	-	-	-	-	-	-	-
4305	0.145	+	-	-	-	-	-	-
4306	0.037	+	-	-	-	-	-	-
4307	0.036	+	-	-	-	-	-	-
4308	0.099	+	-	-	-	-	-	-
4309	0.869	+	-	-	-	-	-	-

4310	0.141	-	-	-	-	-	-	-
4311	0.128	+	-	-	-	-	-	-
4312	0.036	+	-	-	-	-	-	-
4313	0.988	+	-	-	-	-	-	-
4314	0.156	+	-	-	-	-	-	-
4315	0.125	+	-	-	-	-	-	-
4316	0.055	+	-	-	-	-	-	-
4317	0.058	+	-	-	-	-	-	-
4318	0.105	+	-	-	-	-	-	-
4319	0.248	-	-	-	-	-	-	-
4320	0.123	-	-	-	-	-	-	-
Tomate sadio	0.016	-	-	-	-	-	-	-
Tomate sadio	0.019	-	-	-	-	-	-	-
Pimentão sadio	0.018	-	-	-	-	-	-	-
Pimentão sadio	0.042	-	-	-	-	-	-	-

A alta incidência de PepYMV demonstra o aumento da incidência deste vírus em tomateiro. Os materiais comerciais de tomate utilizados atualmente são, aparentemente, todos suscetíveis a PepYMV. O potencial de danos para a produção de tomate causada por isolados de PepYMV, conforme relatado em regiões produtoras do Espírito Santo, é elevado (de Ávila *et al.*, 2004; Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). Acredita-se que os isolados de PepYMV estejam ocupando o nicho que antigamente era ocupado pelos isolados de PVY, vírus que era responsável por perdas importantes em culturas de tomateiro. A partir da introdução de variedades resistentes (Lourenção *et al.*, 2005), o PVY teve sua importância diminuída, dando lugar ao novo potyvírus identificado em 2002 infectando pimentões e pimentas (Inoue-Nagata *et al.*, 2002). Os testes realizados em amostras coletadas nesta região durante os últimos anos demonstram uma alta incidência de begomovírus em tomateiro (Fernandes *et al.*, 2008).

Acredita-se que a inexistência de amostras infectadas com begomovírus no campo 1 foi devido ao estágio ainda precoce da cultura e não foram observadas moscas-brancas nesta lavoura. Já no campo 2, com plantas mais velhas, a incidência de begomovírus foi elevada. O número de amostras coletadas foi pequeno, mas a alta porcentagem de plantas infectadas com isolados de PepYMV, um vírus com grande potencial de dano à cultura do tomate, reforça a necessidade de medidas de controle visando, preferencialmente, a resistência a esse patógeno. Os sintomas causados por PepYMV e os causados por begomovírus muitas vezes se confundem (Figura

1). Ressalta-se também que a identificação de infecções mistas em diversas amostras de campo indica que a interação (sinergismo/antagonismo) entre espécies virais pode constituir-se em um fator complicador na diagnose desses patógenos. Assim, a análise de sintomas não pode ser utilizada para diagnose de modo confiável, sendo necessária a utilização de métodos mais precisos de detecção viral para monitoramento dos campos de cultivo de tomateiro.



**Figura 1.** Sintomas de mosaico em planta de tomateiro infectado com *Pepper yellow mosaic virus* em plantio da região produtora da Taquara / D.F.

O isolado selecionado para ser usado posteriormente nas avaliações de resistência foi o #4284, por não apresentar infecções mistas e causar sintomas severos em plantas indicadoras (dados não apresentados). Posteriormente, o material vegetal infectado com este isolado foi acondicionado a  $- 80^{\circ}$  C para uso na fase de testes.

### **3.2) Avaliação da resistência**

A Tabela 2 apresenta os resultados dos experimentos de busca por fontes de resistência em acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*). Cento e vinte acessos de tomate do banco de germoplasma da Embrapa/Hortaliças

foram avaliados inicialmente para um isolado de PepYMV. A grande maioria das plantas testadas não apresentou sintomas intensos, como os observados em condições de campo por Maciel-Zambolim *et al.* (2004) e de Ávila *et al.* (2004). Até mesmo nas plantas de tomate da cultivar 'Alambra' (usadas como controle positivo) apresentaram sintomas suaves durante o experimento (Figura 2). No entanto, o resultado da análise via ELISA mostrou a presença do vírus nessas plantas. A ocorrência de infecções latentes também foram observadas em acessos de *S. lycopersicum* utilizados em avaliações prévias em busca de fontes de resistência ao PepYMV (Juhász *et al.*, 2006). Neste experimento, foi observada infecção sem a exibição de sintomas típicos em 52 acessos de *S. lycopersicum*, sendo a infecção detectada apenas através de ELISA indireto. Como indicado por Rowhani (1997), a ocorrência de sintomas virais pode ser influenciada pelas condições ambientais e/ou características intrínsecas do isolado e da variedade testada.

**Tabela 2.** Acessos testados para resistência a PepYMV. Os acessos em vermelho apresentaram resistência, sem expressão de sintomas e resultado negativo em ELISA para todas as plantas.

Número do Acesso	Nome comum	Espécie	Resultado em ELISA*
043	KADA	<i>S. lycopersicum</i>	6/6
015	74T2	<i>S. lycopersicum</i>	6/9
045	Anahu	<i>S. lycopersicum</i>	2/6
046	Angela Hiper	<i>S. lycopersicum</i>	6/6
095	Príncipe Gigante	<i>S. lycopersicum</i>	6/6
101	PI 306811-67-N-4	<i>S. peruvianum</i>	6/6
102	PI126408-6	<i>S. peruvianum</i>	4/6
200	PI 732293-2V	<i>S. pimpinellifolium</i>	6/6
201	LA444-1	<i>S. peruvianum</i>	1/9
202	Angela Gigante	<i>S. lycopersicum</i>	2/6
277	Stakeless	<i>S. lycopersicum</i>	1/6
374	Selection IMRA	<i>S. peruvianum</i>	2/6
380	Angela Gigante	<i>S. lycopersicum</i>	2/6
382	PI 732293	<i>S. pimpinellifolium</i>	4/6
402	PI 128659/80	<i>S. peruvianum</i>	1/6
409	LA716	<i>S. pennellii</i>	3/6
410	LA 1967	<i>S. chilense</i>	3/6
415	PI 125436	<i>S. pimpinellifolium</i>	4/6
416	PI126445	<i>S. habrochaites</i>	0/9
417	PI 126449	<i>S. habrochaites</i> var. <i>glabratum</i>	1/6
418	PI 126925	<i>S. pimpinellifolium</i>	3/6
419	PI 126941	<i>S. pimpinellifolium</i>	3/6
420	PI127826	<i>S. habrochaites</i>	2/9
421	PI127827	<i>S. habrochaites</i>	0/8
423	PI 134417	<i>S. habrochaites</i> var. <i>glabratum</i>	1/6
424	PI134418	<i>S. habrochaites</i> var. <i>glabratum</i>	1/6

457	Rey de Los Tempranos	<i>S. lycopersicum</i>	5/6
597	WIR-2901	<i>S. pimpinellifolium</i>	2/6
602	-	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	3/6
610	-	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	4/6
769	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	1/9
780	CGO6710	<i>S. peruvianum</i>	2/6
781	CGO6709	<i>S. peruvianum</i>	2/6
782	CGO 6708	<i>S. peruvianum</i>	4/6
783	CGO 6707	<i>S. peruvianum</i>	3/6
785	CGO6712	<i>S. peruvianum</i>	3/6
786	CGO 6713	<i>S. peruvianum</i>	5/6
787	CGO6714	<i>S. habrochaites</i>	2/9
789	LA 1341	<i>S. pimpinellifolium</i>	3/6
790	LA 1342	<i>S. pimpinellifolium</i>	6/6
796	LA1333	<i>S. peruvianum</i>	3/3
797	LA1616	<i>S. peruvianum</i>	1/6
798	LA1616	<i>S. peruvianum</i>	0/9
800	LA2067	<i>S. peruvianum</i>	2/6
925	LA1614	<i>S. pimpinellifolium</i>	3/6
928	WYR3951	<i>S. habrochaites</i>	0/6
931	LA 1270	<i>S. peruvianum</i>	3/5
933	LA 1677	<i>S. peruvianum</i>	3/6
936	LA 111	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	5/6
938	LA 1113-1	<i>S. corneliomuelleri</i>	4/5
939	LA 1113-2	<i>S. corneliomuelleri</i>	1/4
946	TX407	<i>S. peruvianum</i>	0/9
947	TX 410	<i>S. lycopersicum</i> X <i>S. peruvianum</i>	2/6
948	TX 412	<i>S. lycopersicum</i> X <i>S. peruvianum</i>	1/6
956	1-78-7-1F5	<i>S. lycopersicum</i> X <i>S. pimpinellifolium</i>	4/6
970	Colusa	<i>S. lycopersicum</i>	5/6
979	Mariana	<i>S. lycopersicum</i> X <i>S. peruvianum</i>	2/6
980	Camila	<i>S. lycopersicum</i> X <i>S. peruvianum</i>	1/6
1023	-	<i>S. lycopersicum</i>	3/6
1024	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>Amplipinnatum</i>	3/6
1025	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	1/4
1026	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	4/6
1027	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>galeni</i>	4/6
1028	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>galeni</i>	3/6
1029	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>prussiforme</i>	5/6
1030	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>pyriforme</i>	5/5
1031	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>ribesiforme</i>	4/6
1032	-	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>ribesiforme</i>	3/6
1033	-	<i>S. corneliomuelleri</i> ( <i>S. peruvianum</i> ?)	0/9
1034	-	<i>S. habrochaites</i>	1/6
1035	-	<i>S. peruvianum</i>	2/6
1036	-	<i>S. peruvianum</i>	2/6
1037	-	<i>S. pimpinellifolium</i> .	0/6
1038	Lutem	<i>S. pimpinellifolium</i>	2/6
1039	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	2/6
1040	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	3/6
1045	Tomate de casca	<i>Physalis</i> sp.	6/6
1114	Cereja rubi/2	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> .	3/6
1115	Cereja rubi/3	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> .	1/6
1116	Cereja rubi/4	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> .	2/6
1121	L.03683	<i>S. habrochaites</i>	0/6
1122	L.03684	<i>S. habrochaites</i>	0/6
1123	L.03707	<i>S. pimpinellifolium</i>	5/6
1124	L.03708	<i>S. pimpinellifolium</i>	1/6
1194	CGO8200	<i>S. peruvianum</i>	2/6
1195	CGO7650	<i>S. pimpinellifolium</i>	4/6

1238	LA1963	<i>S. chilense</i>	0/6
1249	LA372 (97L7524)	<i>S. peruvianum</i>	3/6
1277	PI 128660	<i>S. peruvianum</i>	4/6
1287	PI126445	<i>S. habrochaites</i>	1/6
1288	PI247087	<i>S. habrochaites</i>	0/6
1289	PI128650	<i>S. habrochaites</i>	1/6
1290	PI126449	<i>S. habrochaites</i> var. <i>glabratum</i>	0/6
1298	H 1548	<i>S. lycopersicum</i>	5/6
1434	LA0103	<i>S. peruvianum</i>	0/9
1435	LA 0107	<i>S. peruvianum</i>	1/6
1436	LA0153 (PI126944)	<i>S. peruvianum</i>	0/3
1438	LA0444	<i>S. peruvianum</i>	1/9
1439	LA 0454	<i>S. peruvianum</i>	3/6
1440	LA 1274	<i>S. peruvianum</i>	1/6
1444	LA 1339	<i>S. peruvianum</i>	3/6
1445	LA 1351	<i>S. peruvianum</i>	4/6
1452	LA 1609	<i>S. peruvianum</i>	1/6
1454	LA 1910	<i>S. peruvianum</i>	1/3
1456	LA 1937	<i>S. peruvianum</i>	1/2
1459	LA 1954	<i>S. peruvianum</i>	3/6
1461	LA 1982	<i>S. peruvianum</i>	2/6
1462	LA 1984	<i>S. peruvianum</i>	1/3
1463	LA 2152	<i>S. peruvianum</i>	4/6
1464	LA 2157	<i>S. peruvianum</i> var. <i>humifusum</i>	1/6
1465	LA2163	<i>S. peruvianum</i>	4/4
1466	LA2172	<i>S. peruvianum</i>	1/6
1467	LA2185	<i>S. peruvianum</i>	5/6
1468	LA2328	<i>S. peruvianum</i>	5/6
1469	LA2553	<i>S. peruvianum</i>	3/6
1470	LA2732	<i>S. peruvianum</i>	2/6
1471	LA 2744	<i>S. peruvianum</i>	1/6
1473	LA2981B	<i>S. peruvianum</i>	1/2
1555	LA1792	<i>S. pimpinellifolium</i>	4/6
1556	LA2934/PI126430	<i>S. pimpinellifolium</i>	3/4

\* O número de plantas reagentes em ELISA sobre número de plantas inoculadas



**Figura 2.** Folha de tomateiro da cultivar 'Alambra', positiva em ELISA para PepYMV, apresentando sintomas suaves de mosaico.

Fontes de resistência caracterizadas por uma resposta semelhante à imunidade (ausência de sintomas e sorologia negativa) foram identificadas nos seguintes acessos: *S. habrochaites* 'PI-126445'; 'PI-127827'; 'WYR3951'; 'L.03683' e 'L.03684'; *S. habrochaites* var. *glabratum* 'PI-126449'; *S. peruvianum* 'LA-0103'; 'LA-0153' e 'LA-1616'; *S. corneliomuelleri* 'CNPH 1033'; *S. chilense* 'LA-1963'; *S. pimpinellifolium* 'CNPH 1037' e no acesso 'CNPH Tx 407', resultante de um cruzamento interespecífico (*S. lycopersicum* x *S. peruvianum*). É interessante mencionar que as três seleções da cultivar Ângela, desenvolvida como resistente a PVY na década de 1960 (Nagai, 1993), apresentaram plantas positivas para a infecção por PepYMV.

### **3.3) Análise do espectro de resistência**

Para se verificar o espectro da resistência para outros potyvírus, todos os acessos que apresentaram resultados negativos em ELISA para PepYMV e o restante dos acessos da espécie *S. habrochaites* (Tabela 2) foram inoculados com um isolado de PVY (Lopes 1). A Tabela 3 apresenta os

resultados obtidos neste ensaio usando inoculação mecânica e avaliação através de DAS-ELISA. A seleção 'Ângela Hiper' ('CNPH 0046'), 'CNPH 1037' ('HBH-16') e *S. habrochaites* 'CNPH 0928' ('WYR 3951') e 'CNPH 0421' (PI 127827) se mostraram extremamente suscetíveis, indicando a viabilidade do inóculo.

Como verificado nesse experimento, somente dois acessos de *S. habrochaites*, além de apresentarem resistência ao PepYMV, também apresentaram resistência a esse isolado de PVY, não apresentando sintomas claros e acúmulo viral em todos os indivíduos avaliados. *Solanum corneliomuelleri* 'CNPH 1033' foi um material interessante que justifica um trabalho de seleção visando confirmar seus níveis de resistência às duas espécies de *Potyvirus* avaliadas. *Solanum corneliomuelleri* é uma espécie autoincompatível/alógama e o aparecimento de algumas plantas suscetíveis pode ser reflexo da falta de homogeneidade genética dentro de acessos desta espécie. Juhász *et al.* (2006) testaram um grande número de acessos buscando fontes de resistência para PepYMV. O resultado obtido por este grupo foi equivalente. Em todos os indivíduos testados, somente um acesso de *S. habrochaites* apresentou resistência a PepYMV.

O experimento aqui apresentado identificou dois acessos selvagens de *S. habrochaites* como potenciais fontes de resistência, não somente a PepYMV, como também a PVY (acessos 'CNPH 1121' e 'CNPH 1122'). A resistência a ambos os vírus pode ser condicionada pela presença do gene *pot-1* (Ruffel *et al.*, 2005) ou de um alelo deste gene, já que *S. habrochaites* é a fonte deste caractere de resistência.

**Tabela 3.** Acessos de tomate inoculados com PVY para avaliação do espectro de resistência a potyvírus. Todos os acessos de *S. habrochaites* testados anteriormente foram adicionados nesse teste devido a possibilidade de apresentarem resistência a PVY. Os acessos em vermelho foram os quais apresentaram resultado negativo em ELISA para todas as plantas testadas.

Número do acesso	Nome comum	Espécie	Positivas em ELISA*
046	Angela Hiper	<i>S. lycopersicum</i>	5/6
290			4/6
416	PI 126445	<i>S. habrochaites</i>	4/6
420	PI 127826	<i>S. habrochaites</i>	1/6
421	PI 127827	<i>S. habrochaites</i>	5/6
787	CGO 6714	<i>S. habrochaites</i>	1/6
798	LA 1616	<i>S. peruvianum</i>	2/6
928	WYR 3951	<i>S. habrochaites</i>	6/6
946	TX 407	<i>S. peruvianum</i>	5/6
1033	-	<i>S. corneliomuelleri</i>	1/6
1037	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	6/6
1121	L 03683	<i>S. habrochaites</i>	0/6
1122	L 03684	<i>S. habrochaites</i>	0/6
1238	LA 1963	<i>S. chilense</i>	5/6
1287	PI 126445	<i>S. habrochaites</i>	3/6
1288	PI 247087	<i>S. habrochaites</i>	1/6

\*Número de plantas positivas em ELISA sobre número de plantas inoculadas.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a importância de *S. habrochaites* como fonte de fatores de resistência a múltiplas espécies de *Potyvirus*. O presente trabalho também corresponde ao primeiro relato da resistência genética a PepYMV em acessos de outras espécies de *Solanum* (secção *Lycopersicon*), tais como *S. corneliomuelleri* e *S. peruvianum*, o que provavelmente representa a ampliação da base genética de fatores de resistência à espécies de potyvírus. No ponto de vista do melhoramento genético, a identificação de acessos resistentes derivados de *S. habrochaites* e *S. pimpinellifolium*, permitem cruzamentos sem barreiras e estudos genéticos da herança da resistência nestas espécies.

## **Capítulo 3**

**Identificação de fontes de resistência múltipla em germoplasma de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) ao complexo de espécies neotropicais de *Tospovirus***

## 1) INTRODUÇÃO

A doença de nome *spotted wilt* foi descrita pela primeira vez na Austrália em 1915 (Brittlebank, 1919). Samuel *et al.* (1930) conseguiram demonstrar que a doença era de etiologia viral e denominaram o agente causal como *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). No Brasil, o TSWV foi descrito pela primeira vez por Silberschmidt (1937), causando a doença então denominada “vira-cabeça” em fumo. Os tospovírus pertencem à família *Bunyaviridae*, formada por vírus compostos por RNA senso negativo que infectam, além de plantas, pequenos mamíferos, bem como primatas e pássaros e são transmitidos principalmente por mosquitos, moscas ou carrapatos. Essa família é composta pelos gêneros *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* (Fauquet *et al.*, 2005). A classificação atual do gênero *Tospovirus* baseia-se principalmente na morfologia do vírion, na organização do genoma e nas características da transmissão por tripes. Já em relação às espécies, são consideradas as características biológicas, como círculo de hospedeiros e espécies do vetor, e características moleculares, considerando-se como espécies distintas aquelas que apresentarem identidade inferior a 90%, quando se compara a seqüência de aminoácidos da proteína N (de Ávila *et al.*, 1993; Resende, 1995; Roselló *et al.*, 1996).

As espécies do gênero *Tospovirus* infectam mais de 1000 espécies de plantas, monocotiledôneas e dicotiledôneas, pertencentes a mais de 82 famílias botânicas, e é fator limitante da produção de tabaco (*Nicotiana tabacum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), tomate (*Solanum lycopersicum*), pimenta (*Capsicum annum*) e várias espécies de plantas ornamentais (Fauquet *et al.*, 2005). Os sintomas causados pela infecção por tospovírus são diversos. Em hospedeiros não-sistêmicos os sintomas se restringem a lesões locais, clorose e necrose. Já em hospedeiros sistêmicos são evidenciados os seguintes sintomas: paralisação do crescimento, arroxamento ou bronzeamento das folhas, manchas em anéis concêntricos, deformação foliar severa, clorose, mosqueado e necrose intensa. Plantas com sintomas típicos podem produzir frutos aparentemente sadios, porém, de menor tamanho. Frutos atacados ainda não maduros frequentemente

desenvolvem estrias e anéis necróticos irregulares. Quando maduros, evidenciam-se anéis concêntricos. O nível de expressão de sintomas pode ser amplamente influenciado pela idade da planta, número de isolados infectando a hospedeira e fatores ambientais, principalmente a temperatura (Lopes & de Ávila, 2005). Em locais de clima ameno, o dano causado por tospovírus normalmente se restringe a casas de vegetação (Soler *et al.*, 2003). Este grupo de vírus causa grandes danos à cultura de hortaliças, além de ser uma grande ameaça à produção de ornamentais (de Ávila *et al.*, 1993). As perdas causadas por este vírus em plantios de cultivares suscetíveis de tomateiro pode atingir até 95% sob condições ambientais adequadas ao desenvolvimento da doença (Giordano *et al.*, 2000).

O gênero *Tospovirus* foi considerado inicialmente como monotípico, sendo TSWV a única espécie descrita no gênero. No entanto, estudos de caracterização biológica e molecular de isolados de diversos continentes indicaram a existência de um grande número de novas espécies dentro deste gênero (de Ávila *et al.*, 1992; Pozzer *et al.*, 1996; Bezerra *et al.*, 1999; Prins & Goldbach, 1998). A lista crescente de espécies inclui até o presente momento os seguintes vírus: TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Watermelon bud necrosis virus* (WBNV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV), *Groundnut chlorotic fan-spot virus* (GCFSV), *Groundnut yellow spot virus* (GYSV), *Physalis severe mottle virus* (PhySMV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV) (Fauquet *et al.*, 2005). Mais recentemente foram descritas as espécies *Tomato fruit yellow ring virus* (TFYRV) (Winter *et al.*, 2006); *Calla lily chlorotic spot virus* (CCSV) (Chen *et al.*, 2005), *Tomato yellow ring virus* (TYRV) (Mehraban *et al.*, 2005) e *Tomato zonate spot virus* (TZSV) (Dong *et al.*, 2008).

TSWV, TCSV, GRSV e CSNV são as espécies predominantes infectando o tomateiro na América do Sul, estando disseminadas em todas as regiões produtoras do Brasil e da Argentina (Giordano *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001). Estes quatro vírus compõem um grupamento de espécies que têm como provável centro de origem as regiões neotropicais (Resende, 1995; Fauquet *et al.*, 2005). TSWV é atualmente cosmopolita (Prins & Goldbach,

1998; Whitfield *et al.*, 2005), GRSV tem sido reportado infectando soja na África do Sul (Pietersen & Morris, 2002) e amendoim na Argentina (de Breuil *et al.*, 2007), enquanto TCSV e CSNV permanecem ainda, aparentemente, endêmicas no Continente Sul Americano (Bezerra *et al.*, 1999).

Os tospovírus são transmitidos por um grupo restrito de espécies de tripes. Das 5000 espécies existentes, nove são consideradas vetores virais (Mound, 1996). As espécies *Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei*, *Thrips tabaci* e *T. palmi* já foram isoladas no Brasil (Nagata *et al.*, 1999). Dentre estas, *F. schultzei* foi considerado o vetor mais eficiente nas condições ambientais brasileiras. Este inseto é o principal transmissor de GRSV em condições naturais, o que pode explicar a prevalência desse vírus nos plantios de tomate do Brasil (Nagata *et al.*, 2004). Os tripes adquirem o vírus no primeiro instar, quando as larvas se alimentam de folhas contaminadas, caracterizando-se como uma transmissão do tipo circulativa-propagativa. O ciclo de vida dos adultos alados varia de 30 a 45 dias, período pelo qual podem transmitir o vírus. Depois da aquisição pelo tripes, o vírus chega até as células epiteliais do intestino médio, onde se replica. A partir deste ponto, as partículas virais vão até as glândulas salivares (Nagata *et al.*, 1999). As glicoproteínas Gc e Gn foram identificadas como responsáveis pela interação do vírus com as células do intestino médio do inseto, bem como com a circulação do mesmo dentro do corpo do vetor (Wijkamp *et al.*, 1995). Após a transmissão do vírus para a célula de uma planta hospedeira, o vírus é liberado de sua membrana e o nucleocapsídeo adentra o citoplasma. Nessa fase, o RNA viral é transcrito ou replicado pela RNA polimerase dependente de RNA (Hull, 2002). O genoma dos tospovírus é sujeito a mutações devido à sua constituição ser baseada em três segmentos de RNA. Como este não possui um mecanismo de reparo (*proof-reading*) durante a replicação viral, os índices de mutação podem ser elevados (Roossinck, 1994). Dessa forma, o surgimento de novos isolados capazes de suplantarem genes de resistência estabelecidos é relativamente comum dentro de uma dada espécie (Herrero *et al.*, 2000). O controle deste vetor é difícil, pois métodos físicos, químicos e biológicos não são muito eficientes. Podem reduzir o dano causado pelos insetos a um nível economicamente viável, mas não o suficiente para evitar a dispersão da doença. Desta forma, a busca por resistência genética se tornou

a principal ferramenta para controle das tospoviroses, assim como para a grande maioria dos vírus que afetam plantios pelo mundo (Roselló *et al.*, 1996).

Através dos anos, várias fontes de resistência genética aos tospovírus têm sido encontradas em avaliações de germoplasma de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) contra isolados de tospovírus (principalmente TSWV) oriundos de regiões geográficas distintas (Samuel *et al.*, 1930; Kikuta & Frazier, 1946; Holmes, 1948; Finlay, 1953; Nagai, 1975; Araújo *et al.*, 1983; Paterson *et al.*, 1989; Maluf *et al.*, 1991; Boiteux *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1993; Nagai, 1993; Stevens *et al.*, 1994; Lourenção *et al.*, 1997; Canady *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005; Gordillo *et al.*, 2008). As principais fontes de fatores de resistência a tospovírus têm sido identificadas na espécie *S. peruvianum*. Vários acessos foram identificados apresentando respostas do tipo imunidade ou com reações de hipersensibilidade (Paterson *et al.*, 1989; Stevens *et al.*, 1994; Roselló *et al.*, 1999). O principal fator de resistência utilizado até o presente momento é o gene *Sw-5*, que foi identificado em um acesso de *S. peruvianum* (Stevens *et al.*, 1992). Este gene, primeiramente introgridido na cultivar sul-africana 'Stevens' (van Zijl *et al.*, 1986), têm sido empregado em grande escala nos principais programas de melhoramento genético do tomateiro (Scott, 2008). Além de monogênico e dominante, demonstrou-se muito estável, conferindo resistência ampla a diferentes isolados e/ou espécies de tospovírus que infectam o tomateiro (Stevens *et al.*, 1992; Boiteux & Giordano, 1993; Roselló *et al.*, 1998; Brommonschenkel *et al.*, 2000). Cultivares contendo o gene *Sw-5* muitas vezes não apresentam sintomas de mosaico sistêmico, apesar do surgimento de lesões necróticas locais nas folhas inoculadas, característica de resistência regida por gene dominante (Brommonschenkel *et al.*, 2000). O gene *Sw-5*, mapeado no cromossomo 9, tem sido amplamente usado no desenvolvimento de variedades de tomate híbridas. Esse uso tem levado a uma queda considerável nas perdas econômicas causadas pelos tospovírus.

No entanto, o gene *Sw-5* apresenta algumas importantes limitações. A expressão da resistência pode ser negativamente afetada em condições de alta pressão de inóculo ou em regiões onde ocorrem drásticas flutuações de temperaturas diurnas e noturnas (de Ávila *et al.*, 1993; Diez *et al.*, 1995;

Roselló *et al.*, 1997; 1998). A expressão fenotípica da resistência controlada pelo gene *Sw-5* não apresenta penetrância completa (Stevens *et al.*, 1992). Dessa forma, linhagens ou híbridos com este gene podem apresentar percentuais variáveis de plantas com sintomas ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento e condições ambientais. As conseqüências mais severas desta característica do gene *Sw-5* é a presença de sintomas e severos danos cosméticos aos frutos verdes e maduros (de Haan *et al.*, 1996) ou até mesmo necrose sistêmica da planta (Lourenção *et al.*, 1997).

Somado a isso, dados recentes indicam que a resistência conferida pelo gene *Sw-5* não pode mais ser considerada durável. Já existem diversos relatos da 'quebra' da resistência do gene *Sw-5* por alguns isolados e/ou espécies de tospovírus a partir de populações naturais em regiões da Europa e Austrália (Cho *et al.*, 1996; Latham & Jones, 1998; McMichael *et al.*, 2002; Aramburu & Marti, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005). Aramburu & Marti (2003) detectaram em áreas de plantio da Espanha, um isolado de TSWV (denominado GRAU) que pode quebrar a resistência conferida por *Sw-5*. Por sua vez, McMichael *et al.* (2002) reportaram que isolados da espécie CaCV conseguem também naturalmente 'quebrar' este gene de resistência.

O surgimento destes isolados virulentos ao gene *Sw-5* demanda ações de pesquisa visando à busca por fontes alternativas de resistência as diferentes espécies de tospovírus que infectam tomateiro. A identificação de tais fontes é extremamente desejável, especialmente no sentido de antecipar problemas econômicos com a potencial emergência e predominância de novas estirpes, patotipos e espécies virais capazes de infectar plantas contendo o gene *Sw-5*. Nesse contexto, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a reação de uma coleção de acessos de tomate selvagens e cultivados do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) contra espécies neotropicais de tospovírus que infectam tomate, visando detectar novas fontes de resistência com potencial para serem utilizadas em programas de melhoramento clássico.

## **2) MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2) Seleção de genótipos resistentes**

#### **2.2.1) Preparo das mudas**

Os acessos selecionados para os testes de resistência a tospovírus fizeram parte de um grupo de 97 acessos de espécies selvagens e cultivadas de *Solanum* (secção *Lycopersicon*). Alguns acessos foram preliminarmente avaliados para resistência a três espécies de tospovírus (Boiteux *et al.*, 2004). Estes acessos foram incluídos no presente ensaio para a re-confirmação do fenótipo de resistência. Em seguida, foram semeados em bandejas de 128 poços com substrato agrícola (Plantmax®). Cerca de 20 a 30 dias após a germinação, quando as plantas apresentavam pelo menos um par de folhas verdadeiras, as mudas foram transplantadas para vasos de 3 litros com solo autoclavado. Para a montagem do experimento foram plantadas três plantas por vaso, três vasos por acesso, sendo que um dos vasos era considerado o controle negativo.

#### **2.2.2) Isolados virais e preparo do inóculo**

Os isolados de tospovírus utilizados nesse experimento foram selecionados de amostras armazenadas em freezer a -80° C e previamente verificadas através de ELISA para checar a contaminação por outros vírus. Estes isolados biologicamente identificados foram em seguida inoculados mecanicamente em *Datura stramonium*, dez dias antes do uso nos acessos a serem testados. Plantas apresentando sintomas intensos foram usadas como extrato para inoculação mecânica dos acessos em tampão de inoculação contendo fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) 0,01 M e sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) 1% (P/V) em água destilada. A proporção de extrato/tampão foi de 1:10. Os isolados utilizados nesse experimento foram: TCSV ('BR-03'), GRSV ('AS-05'), CSNV ('Chr-1') e TSWV ('BR-01').

### **2.2.3) Inoculação dos genótipos**

Todas as plantas dos acessos testados foram polvilhadas com carborundum (400 mesh) e todas as folhas foram inoculadas mecanicamente com tampão fosfato de sódio e extrato de plantas de *D. stramonium* sintomáticas. Em seguida, o experimento foi irrigado para se retirar o excesso de carborundum e evitar a queima das folhas. Quarenta e oito horas depois foi realizada uma segunda inoculação seguindo o mesmo método, procurando-se reduzir significativamente o nível de escape, como recomendado por Boiteux & de Ávila (1994).

### **2.2.4) Avaliação da reação de acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) a isolados de TCSV, GRSV, CSNV e TSWV**

Os experimentos foram realizados em casas de vegetação da Embrapa CNPH (Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças) em Brasília-D.F., com a temperatura variando entre 20° C e 40° C. Inicialmente, os acessos foram testados com um isolado de GRSV, que é uma das espécies predominantes no cultivo do tomateiro no Brasil. Todos os acessos nessa primeira fase foram analisados a partir de 2 dias pós inoculação através da observação de sintomas com a seguinte escala de notas: 1 = lesões locais sem sintomas sistêmicos, 2 = lesões locais e sintomas sistêmicos suaves e 3 = suscetível com sintomas sistêmicos severos. Os acessos que apresentaram nota 1, ou nota 2 para ambos os vírus, no primeiro teste foram re-inoculados com isolados de quatro espécies de tospovírus que ocorrem no Brasil (TSWV, TCSV, CSNV e GRSV). A acumulação viral foi verificada através de DAS-ELISA (*double antibody sandwich – Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Clark & Adams, 1977) com anticorpos específicos para cada espécie seguindo-se o protocolo: 200 µL de IgG (1,4 µg/mL) diluído 1000 vezes em tampão de revestimento carbonato de sódio, pH 9,6. Em seguida as placas foram incubadas por uma noite a 4° C. Os próximos passos consistiram de: três lavagens com tampão PBS-TWEEN, adição de 100 µL de amostras extraídas em tampão PBS-TWEEN aos poços,

incubação por 2 a 4 horas a 37° C, mais três lavagens com PBS-TWEEN seguidas da adição de 100 µL de IgG conjugado diluído (1000 vezes) em PBS-TWEEN e incubação por 2 a 4 horas a 37° C. Para se executar o processo de revelação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-TWEEN e em seguida foi adicionado 100 µL de substrato da enzima fosfatase alcalina em tampão de dietanolamina (1 µg/mL) por poço e armazenadas em ambiente escuro. As leituras das placas foram feitas em leitor de ELISA Labsystem Multiscan® Bichromatic a 405 nm.

O grupo de plantas que não apresentou sintomas ou resultados positivos em ELISA foi novamente inoculado com GRSV e com isolados de TCSV, TSWV e CSNV. Quinze dias após a inoculação, um novo teste ELISA foi realizado, como descrito anteriormente. Plantas sem sintomas foram transferidas para vasos maiores e mantidas em casas de vegetação para a verificação de infecção sistêmica latente.

### **3) RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1) Seleção de acessos resistentes**

Noventa e sete acessos de diferentes espécies de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) foram testados inicialmente para resistência a GRSV, que é uma das espécies mais importantes em termos econômicos na cultura do tomateiro no Brasil (Nagata *et al.*, 1999), via inoculação mecânica, para uma filtragem do material a ser testado posteriormente para resistência múltipla. Os resultados obtidos por Gordillo *et al.* (2008) demonstram a efetividade da combinação da técnica de inoculação mecânica e ELISA para a análise de materiais resistentes, o que foi confirmado nos experimentos realizados neste trabalho. O grupo com respostas promissoras ao GRSV apresentou acessos assintomáticos, que mostraram somente reação do tipo lesão local necrótica cerca de quatro dias após a inoculação ou sintomas fracos em poucos indivíduos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Reação de acessos de *Solanum* (Secção *Lycopersicon*) com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) via inoculação mecânica. Um subgrupo de acessos (resistentes e suscetíveis) foi selecionado para comprovação da resistência com isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e GRSV (marcados em vermelho).

<b>Acesso CNPH</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Espécie</b>	<b>Plantas com sintomas /total</b>	<b>Notas*</b>
0043	Kada	<i>S. lycopersicum</i>	06/06	3
0046	Angela Hiper	<i>S. lycopersicum</i>	06/06	3
0067	De la Plata	<i>S. lycopersicum</i>	05/05	3
0079	Silvestre de Piranga	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	02/05	3
0080	Silvestre de Araxá	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	03/05	3
0081	Silvestre de Felixlândia	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	05/05	3
0083	Silvestre Vit Sto Antão	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	05/05	3
0095	Príncipe Gigante	<i>S. lycopersicum</i>	06/06	3
0101	PI 306811-67-N-4	<i>S. peruvianum</i>	04/11	2
0199	PI 732293 Nagai 1	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. pimpinellifolium</i>	04/05	3
0200	PI 732293 Nagai 2	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. pimpinellifolium</i>	05/05	3
0202	Ângela Gigante I5100	<i>S. lycopersicum</i>	06/06	3
0353	Silvestre de Altamira	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	05/05	3
0357	Silvestre de Vitória	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	04/04	3
0380	Ângela Gigante	<i>S. lycopersicum</i>	06/06	3
0382	PI 732293 Nagai 3	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. pimpinellifolium</i>	05/05	3
0390	Silvestre do Pará	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	04/05	3
0410	LA 1967	<i>S. chilense</i>	00/06	1
0416	PI 126445	<i>S. habrochaites</i>	01/01	3
0419	PI 126931	<i>S. pimpinellifolium</i>	06/06	3
0421	PI 127827	<i>S. habrochaites</i>	02/05	2
0447	LA 258	<i>S. lycopersicum</i>	00/05	1
0448	Rick 3-71	<i>S. lycopersicum</i>	04/05	3
0449	LA 1663	<i>S. lycopersicum</i>	05/05	3
0457	Rey de Los Tempranos	<i>S. lycopersicum</i>	07/11	3
0458	PI 279567 (P. Harbor)	<i>S. lycopersicum</i>	05/05	3
0513	IVT-3	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. peruvianum</i>	01/05	3
0610	Niva / USSR	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	03/06	3
0613	Quil-Quil	<i>S. lycopersicum</i>	05/05	3
0633	Silvestre de Brasília	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	03/05	3
0634	Silvestre de Calambaú	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	05/05	3
0635	Silvestre de Ipuã	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	01/05	3
0768	Pearl Harbor	<i>S. lycopersicum</i>	05/05	3
0769	VC8 Martinus	<i>S. pimpinellifolium</i>	01/05	3
0782	CGO 6708	<i>S. peruvianum</i>	02/11	2
0783	CGO 6707	<i>S. peruvianum</i>	06/06	3
0785	CGO 6712	<i>S. peruvianum</i>	02/05	3
0786	CGO 6713	<i>S. peruvianum</i>	03/11	2
0787	CGO 6714	<i>S. peruvianum</i>	03/11	2
0789	LA 1341	<i>S. pimpinellifolium</i>	06/06	3
0798	LA 1616	<i>S. peruvianum</i>	06/06	3
0864	LS 121 Japan	<i>S. peruvianum</i>	02/05	3
0919	Stevens	<i>S. lycopersicum</i>	01/04	1
0931	LA 1270	<i>S. peruvianum</i>	01/06	1
0932	LA 1333	<i>S. peruvianum</i>	00/05	1
0933	LA 1677	<i>S. peruvianum</i>	00/11	1
0934	WYR 2020	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	03/05	3
0935	WYR 3957	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	05/05	3
0936	LA 111	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	05/11	2
0937	LA 385	<i>S. peruvianum</i> var. <i>humifusum</i>	00/05	1
0938	LA 1113-1	<i>S. corneliomuelleri</i>	04/11	2
0939	LA 1113-2	<i>S. corneliomuelleri</i>	04/11	2

0940	LA 1113-3	<i>S. peruvianum</i> var. <i>glandulosum</i>	02/05	3
0941	ID 8623	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	03/05	3
0942	ID 8624	<i>S. peruvianum</i> var. <i>humifusum</i>	01/05	3
0944	LA 1036	<i>S. chmielewskii</i>	05/05	3
0945	LA 1716	<i>S. neorickii</i> = <i>L. parviflorum</i>	05/05	3
0947	Tx 410	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. peruvianum</i>	00/05	1
0951	RLT Izuka	<i>S. lycopersicum</i>	03/05	3
0955	Japan Izuka	<i>S. pimpinellifolium</i>	02/05	3
0956	PI 732293 Nagai Izuka	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. pimpinellifolium</i>	00/05	1
0996	PI 319.369	<i>S. peruvianum</i>	00/05	1
0997	PI 390.715	<i>S. peruvianum</i>	01/05	3
0998	PI 390.687	<i>S. peruvianum</i>	05/05	3
0999	PI 118.784	<i>S. peruvianum</i>	01/05	3
1000	PI 127.813	<i>S. peruvianum</i>	03/05	3
1034	HBH	<i>S. habrochaites</i>	04/06	3
1035	HBH	<i>S. peruvianum</i>	03/06	3
1036	HBH	<i>S. peruvianum</i>	02/06	2
1155	(LA1969 x Lignon) A7	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. chilense</i>	05/05	3
1156	(LA1969 x Lignon) A49	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. chilense</i>	05/05	3
1157	(LA1969 x Lignon) C23	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. chilense</i>	04/05	3
1194	CGO 8200	<i>S. peruvianum</i>	02/06	2
1195	CGO 7650	<i>S. pimpinellifolium</i>	06/06	3
1277	PI 128660	<i>S. peruvianum</i>	04/06	3
1298	H 1548	<i>S. lycopersicum</i>	06/06	3
1435	LA 107	<i>S. peruvianum</i>	02/04	3
1436	LA 0153	<i>S. peruvianum</i>	00/05	1
1438	LA 0444	<i>S. peruvianum</i>	03/05	3
1440	LA 1274	<i>S. peruvianum</i>	02/05	3
1443	LA 1331	<i>S. peruvianum</i>	02/02	3
1444	LA 1339	<i>S. peruvianum</i>	02/05	3
1445	LA 1351	<i>S. peruvianum</i>	05/05	3
1452	LA 1609	<i>S. peruvianum</i>	00/05	1
1459	LA 1954	<i>S. peruvianum</i>	03/05	3
1462	LA 1984	<i>S. peruvianum</i>	02/05	3
1463	LA 2152	<i>S. peruvianum</i> var. <i>humifusum</i>	00/05	1
1464	LA 2157	<i>S. peruvianum</i>	02/05	3
1465	LA 2163	<i>S. peruvianum</i>	04/05	3
1466	LA 2172	<i>S. peruvianum</i>	03/05	3
1467	LA 2185	<i>S. peruvianum</i>	05/05	3
1468	LA 2328	<i>S. peruvianum</i>	05/05	3
1470	LA 2732	<i>S. peruvianum</i>	01/05	3
1471	LA 2744	<i>S. peruvianum</i>	00/05	1
1472	LA 2964	<i>S. peruvianum</i>	00/05	1
1560	BHRS 1,2	<i>S. lycopersicum</i>	03/05	3
1737	'PI 203230' (RLT)	<i>S. lycopersicum</i>	00/08	1

\* Notas: 1 = sem sintomas ou ocorrência de lesão local sem sintomas sistêmicos; 2 = poucos sintomas locais ou sistêmicos; 3 = muitos sintomas sistêmicos.

Diversos acessos apresentaram extrema suscetibilidade ao GRSV, apresentando 100% de plantas com sintomas severos. Neste caso estão quase todos os acessos de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, uma variedade de tomate silvestre de ocorrência espontânea e altamente disseminada no Brasil e todas as variedades de tomate cultivado (*S. lycopersicum*) do grupo varietal 'Santa Cruz' (ex. 'Kada', 'Angela Hiper', 'Príncipe Gigante' e seleções

de 'Ângela Gigante'). Estas variedades predominaram no Brasil da década de 1940 até 1990, ainda sendo atualmente plantadas em várias regiões no Brasil (Melo *et al.*, 2008). Esta alta suscetibilidade deste grupo varietal explica a enorme importância econômica que a doença "vira-cabeça" apresentava no cultivo do tomate e o grande esforço de pesquisa empregado durante este período para controlar esta doença via cultivares com resistência genética (Nagai, 1975; 1993; Melo *et al.*, 2008). Vinte e quatro acessos apresentaram respostas que foram classificadas como resistência. A reação fenotípica de alguns acessos foi caracterizada pela ocorrência de lesões necróticas nas folhas inoculadas (sem invasão sistêmica) (Figura 1). Alguns poucos acessos apresentaram reação semelhante à resposta imune (i.e. completa ausência de sintomas e nenhuma invasão sistêmica).



**Figura 1.** Acesso de tomate selvagem da espécie *S. peruvianum* apresentando lesão local necrótica resultante de reação de resistência após inoculação com isolado BR-01 de *Tomato spotted wilt virus*.

Os acessos considerados resistentes, apresentando poucos sintomas ou plantas que apresentaram somente pontos necróticos que não evoluíram para sintomas sistêmicos, foram re-avaliados para comprovação do espectro de resistência via inoculação mecânica com os seguintes isolados: TCSV ('BR-03'), GRSV ('AS-05'), CSNV ('Chr-1') e TSWV ('BR-01'). A reação destes acessos foi avaliada através de ELISA e observação de sintomas (Tabela 2). Todos os controles suscetíveis exibiram sintomas sistêmicos, indicando a viabilidade do inóculo das quatro espécies, bem como

representaram uma pressão de inóculo razoavelmente uniforme que contribuiu para o experimento. Uma grande maioria dos acessos que apresentou resistência no primeiro ensaio exibiu resposta similar neste segundo ensaio, indicando uma resposta de resistência ao vírus. No entanto, alguns acessos ainda apresentaram alguns indivíduos expressando sintomas. Estes resultados podem ser explicados pela questão de penetrância do(s) gene(s) de resistência, ou podem ser justificados pela variação genética que naturalmente ocorre dentro dos acessos, especialmente os da espécie *S. peruvianum*. A grande maioria dos acessos com melhores níveis de resistência foram detectados dentro da espécie *S. peruvianum*. Este resultado era de certa forma esperado, uma vez que essa espécie é a fonte do gene Sw-5, principal gene de resistência de amplo espectro utilizado nos programas de melhoramento genético em todo o mundo (Stevens *et al.*, 1992).

**Tabela 2.** Reação de acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) previamente selecionados inoculados mecanicamente com isolados de *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) analisados através de ELISA e/ou observação de sintomas.

Acesso			Resultado			
CNPH	Nome comum	Espécie	GRSV	CSNV	TSWV	TCSV
0101	PI 306811-67-N-4	<i>S. peruvianum</i>	00/16	00/10	00/16	00/16
0410	LA 1967	<i>S. chilense</i>	04/22	04/05	03/17	03/22
0421	PI 127827	<i>S. habrochaites</i>	00/22	00/06	06/22	01/17
0447	LA 258	<i>S. lycopersicum</i>	01/12	NA*	00/13	02/12
0782	CGO 6708	<i>S. peruvianum</i>	00/22	00/04	00/22	00/22
0786	CGO 6713	<i>S. peruvianum</i>	00/22	00/06	00/22	01/22
0787	CGO 6714	<i>S. peruvianum</i>	00/16	00/10	00/16	00/16
0931	LA 1270	<i>S. peruvianum</i>	00/14	01/06	00/15	00/18
0932	LA 1333	<i>S. peruvianum</i>	02/16	NA	01/16	01/14
0933	LA 1677	<i>S. peruvianum</i>	02/22	00/06	02/22	01/22
0936	LA 111	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	02/19	00/03	00/19	01/18
0937	LA 385	<i>S. peruvianum</i> var. <i>humifusum</i>	02/09	NA	00/03	01/08
0938	LA 1113-1	<i>S. corneliomuelleri</i>	00/14	00/06	01/22	01/22
0939	LA 1113-2	<i>S. corneliomuelleri</i>	01/15	00/06	01/22	02/21
0947	TX 410 (SA x LA 462)	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. peruvianum</i>	01/08	NA	00/08	01/08
0956	PI 732292 Nagai	<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. pimpinellifolium</i>	00/14	NA	01/14	01/14
0996	PI 319369	<i>S. pimpinellifolium</i>	00/07	NA	00/16	00/16
1036	HBH	<i>S. peruvianum</i>	00/22	00/06	00/22	00/21
1194	CGO 8200	<i>S. peruvianum</i>	00/22	00/06	00/22	00/22
1436	LA 136	<i>S. peruvianum</i>	00/03	NA	02/16	01/12
1452	LA 1937	<i>S. peruvianum</i>	00/11	NA	01/16	00/14
1463	LA 2152	<i>S. peruvianum</i> var. <i>humifusum</i>	00/07	NA	02/09	01/05
1471	LA 2744	<i>S. peruvianum</i>	00/07	NA	00/09	00/04
1737	'PI 203230' (RLT)	<i>S. lycopersicum</i>	00/09	00/08	00/10	00/08

\* NA = Não avaliado.

O acesso da espécie *S. lycopersicum* 'CNPH 1737' (uma seleção dentro do 'PI 203230') não apresentou sintomas de infecção por nenhuma das espécies de tospovírus utilizadas nesse último teste, bem como apresentou reação negativa em ELISA. É interessante mencionar que 'PI 203230' é uma seleção da variedade 'Rey de los Tempranos' obtida na Austrália. No entanto, dois outros acessos de 'Rey de los tempranos' ('CNPH 0457' e 'CNPH 0951') apresentaram reação de suscetibilidade ao GRSV (Tabela 1). No segundo ensaio (Tabela 2), 'PI 203230' ('CNPH 1737') apresentou resposta de resistência para todos os isolados, indicando que o processo de seleção previamente efetuado neste acesso foi efetivo em fixar fatores de resistência a espécies de tospovírus encontradas no Brasil (Boiteux *et al.*, 1993; Boiteux *et al.*, 2004). É também interessante notar que seleções de diferentes origens da cultivar 'Pearl Harbor' ('CNPH 0768' e 'CNPH 0458' = 'PI 279567'), uma das primeiras fontes de resistência identificadas para TSWV nos Estados Unidos (Kikuta & Fraazier, 1948), mostraram-se suscetíveis ao isolado de GRSV (Tabela 1).

O acesso de *S. chilense* 'LA 1967' também apresentou um comportamento peculiar nos dois ensaios. Na primeira avaliação, obteve uma nota baixa em relação à expressão de sintomas induzidos por GRSV, mostrando-se resistente. No entanto, no segundo ensaio, o resultado em ELISA indicou um elevado acúmulo do vírus em tecidos infectados para todas as espécies de tospovírus inoculadas, indicando potencialmente um mecanismo de tolerância (*sensu* Cooper & Jones, 1993). Poucas plantas deste acesso apresentaram sintomas ou reações em ELISA, o que demonstra potencialmente uma nova fonte de resistência a esses vírus e seleções dentro deste acesso poderão ser efetivas em aumentar a frequência de plantas resistentes. Acessos de *S. chilense* já foram reportados anteriormente como fonte de resistência a tospovírus (Stevens *et al.*, 1994). Material derivado de *S. chilense* acesso 'LA 1938' apresentou resistência, inclusive a um isolado havaiano de TSWV capaz de quebrar a resistência conferida por Sw-5 e trabalhos relacionados com linhagens avançadas derivadas de *S. chilense* indicam resultados bastante promissores (Canady *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005). É interessante mencionar que o acesso de *S. chilense* 'LA 1967' é uma interessante fonte de genes de resistência a

doenças, sendo detectados bons níveis de tolerância a espécies de *Begomovirus* bipartidos (Giordano *et al.*, 1998; Santana *et al.*, 2001) e resistência do tipo imunidade ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (Reis & Boiteux. 2007).

Os acessos 'PI 306811', 'LA 1967', 'PI 127827', 'CGO 6708', 'CGO 6713', 'CGO 6714', 'LA 1270', 'LA 1677', 'LA 111', 'LA 1113-2', 'CNPB 1036' e 'CGO 8200' (Tabela 2) vêm sendo avaliados repetidas vezes para diferentes isolados de *Tospovirus* desde 2003/2004. De fato, muitos destes acessos já haviam apresentado resultados positivos quando inoculados com TSWV, TCSV e CSNV (Boiteux *et al.*, 2004), indicando que os fatores de resistência múltipla a estas espécies virais podem ter sido fixados em alguns destes acessos. Isso explica os resultados observados em que muitos deles apresentaram uma frequência elevada de plantas resistentes, inclusive alguns exibiram 100% de plantas sem sintomas e com reação negativa em ELISA para as quatro espécies usadas como inóculo (Tabela 2). Por essa razão, é bem provável que outros materiais que exibiram resultados variáveis no primeiro ensaio (segregando para plantas com e sem sintomas) podem conter genes de resistência ainda não identificados, uma vez que muitos dos acessos avaliados são auto-incompatíveis e com tendência a alogamia. Este tipo de seleção cuidadosa pode ser efetiva especialmente dentro de acessos de *S. peruvianum*, *S. corneliomuelleri* e *S. chilense*, permitindo o aumento gradual da frequência de plantas resistentes.

O acesso 'PI 127827', único da espécie *S. habrochaites* que apresentou bons resultados na segunda fase de testes, pode ser considerado um acesso promissor, apesar de que Lourenção *et al.* (1999) em análises de resistência a tospovírus em Campinas (SP), Patos de Minas (MG) e Petrolina (BA), observaram que linhagens derivadas desta espécie (parental 'PI 134417') apresentaram suscetibilidade próxima à dos controles suscetíveis baseando-se unicamente em análises de sintomas, sem distinção da espécie de vírus infectando tais indivíduos. Essa instabilidade da resistência deste acesso não recomenda a indicação deste acesso para uso em programas de melhoramento genético.

O ensaio reportado aqui é o primeiro que avalia um grupo grande de acessos de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) para um número tão variado de

espécies de *Tospovirus*. Gordillo *et al.* (2008) conduziram um dos ensaios mais extensos em termos de busca por resistência a tospovírus, envolvendo um grande número de acessos da espécie *S. peruvianum* que foram avaliados contra dois isolados da espécie TSWV (o isolado 'TSWV6', coletado no Havaí infectando plantas com o gene *Sw-5* e 'Anwa-1', um isolado australiano de menor virulência). É interessante contrastar os resultados obtidos por Gordillo *et al.* (2008) e o ensaio reportado no presente trabalho. Um dado marcante foi que Gordillo *et al.* (2008) não conseguiram identificar nenhum acesso com 100% de plantas resistentes. O acesso *S. peruvianum* 'PI 126946' foi o que apresentou melhor performance com 80% de plantas resistentes. Os acessos *S. peruvianum* 'LA 1616', 'PI 390687' e 'PI 128660' apresentaram reação de suscetibilidade nos dois trabalhos com frequência de plantas suscetíveis variando entre 60% e 100%. No entanto, os dados obtidos para os acessos *S. peruvianum* 'PI 306811', 'LA 1270' e 'LA 1677' considerados resistentes para os isolados de espécies neotropicais, foram considerados suscetíveis por Gordillo *et al.* (2008). Diferentemente do que foi obtido por este grupo, os três acessos apresentaram resistência em todas as plantas testadas com os isolados empregados nos testes de resistência aqui descritos, sendo que somente uma resistência parcial por parte da população de 'LA 1677' pode ser observada pelo grupo americano (50% da população testada). Sugere-se que estes acessos possuam genes ou variantes alélicas similares ao *Sw-5* de tal forma que o perfil de virulência dos isolados empregados ('TSWV6' e 'Anwa-1') resultou em susceptibilidade. Por outro lado, estes potenciais genes ou variantes alélicas similares ao *Sw-5* mostraram-se efetivos contra os isolados das quatro espécies empregados no presente estudo.

Nossos resultados confirmam que a espécie *S. peruvianum* é a fonte mais importante de resistência contra distintas espécies de *Tospovirus* de ampla distribuição nas regiões neotropicais da América do Sul. Fontes de resistência alternativas foram identificadas em acessos das espécies *S. chilense*, *S. corneliomuelleri* e *S. lycopersicum*. A presença de diversidade genética para resistência a espécies de *Tospovirus* é de extremo interesse para os programas de melhoramento, especialmente no caso do surgimento de novos isolados, patótipos e/ou espécies com um perfil de virulência mais

amplo. Além disso, esta diversidade genética na planta hospedeira poderá permitir que diferentes fatores de resistência possam ser “piramidados” em cultivares de tomate e/ou servir de genes alternativos em casos emergenciais.

A disseminação de isolados de tospovírus capazes de quebrar a resistência controlada pelo gene *Sw-5* já tem sido reportada em diferentes continentes (Cho *et al.*, 1996; Latham & Jones, 1998; McMichael *et al.*, 2002; Aramburu & Marti, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005), provavelmente devido ao uso mais extensivo deste gene em cultivares comerciais. A introdução de novos genes na população de tomateiros comerciais permitiria a alternância dos fatores de resistência, contribuindo para reduzir a pressão de seleção para o estabelecimento de novos isolados de *Tospovirus*. Os resultados aqui apresentados servem de base para futuros programas de seleção para a busca de novos materiais de tomate com tendência a apresentar resistência múltipla a uma variedade de espécies dentro do gênero *Tospovirus*.

## **Capítulo 4**

**Desenvolvimento de um marcador co-dominante para o gene *Sw-5* (resistência a *Tospovirus*) para seleção assistida por marcadores a partir de uma ampla gama de acessos de tomate\***

\* Este capítulo foi submetido para publicação em uma versão modificada como:

DIANESE, E.C., FONSECA, M.E.N., GOLDBACH, R., KORMELINK, R., INOUE-NAGATA, A.K., RESENDE, R.O. & BOITEUX, L.S. Development of a co-dominant *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) marker for assisted-selection and allele-specific landing in a wide range of tomato accessions. *Molecular Breeding* (sob revisão), 2009.

## 1) INTRODUÇÃO

Espécies de vírus do gênero *Tospovirus* (família *Bunyaviridae*) são responsáveis pela doença conhecida como “*spotted wilt*”, “peste negra” (Williams *et al.*, 2001) e “vira-cabeça-do-tomateiro” (Silberschmidt, 1937), que causa severas perdas anuais em cultivares de tomates de mesa e para processamento (*Solanum lycopersicum* L.) mundialmente (Gordillo *et al.*, 2008). Estes vírus são transmitidos por tripes (Thysanoptera: Thripidae) de maneira circulativa/ propagativa (Wijkamp *et al.*, 1995). Plantas suscetíveis apresentam manchas cloróticas em folhas, murcha, necroses de tecido, anéis cloróticos e necróticos em frutos, necrose apical, necrose generalizada e/ou bronzeamento. Infecções ocorridas prematuramente em cultivares altamente suscetíveis podem levar a decaimento completo e morte (Lopes & de Ávila, 2005). *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) são as quatro espécies prevalentes de *Tospovirus* em áreas tropicais e sub-tropicais da América do Sul (Giordano *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001).

Fontes de resistência genética a tospovírus têm sido descobertas em *Solanum* (Seção *Lycopersicon*), selvagens e cultivados (Soler *et al.*, 2003). Espécies de tomate selvagens são consideradas as melhores fontes de resistência, sendo que muitos acessos foram considerados tolerantes ou imunes a isolados e espécies distintas (Paterson *et al.* 1989; Stevens *et al.*, 1994; Roselló *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2003; Gordillo *et al.*, 2008). Até o momento, os melhores níveis de resistência de amplo-espectro a tospovírus são conferidos pelo gene derivado de *S. peruvianum*, que foi introgridido no cultivar “Stevens” (Stevens *et al.*, 1992). Este complexo locus de resistência foi nomeado Sw-5 e plantas que o expressam são capazes de restringir a distribuição sistêmica do vírus, apresentando somente sintomas localizados representados por lesões locais causadas por reação de hipersensibilidade (HR) (Stevens *et al.*, 1992). O locus Sw-5 foi mapeado no braço longo do cromossomo 9 e foi isolado através de clonagem posicional (Brommonschenkel *et al.*, 2000; Spassova *et al.*, 2001). Além disso, foi verificado que o fator de resistência a tospovírus reside em um complexo

formado por cinco cópias do gene, denominadas *Sw-5a* a *Sw-5e* (Spasova *et al.*, 2001). A eficiência de cada cópia em conferir resistência ainda não está totalmente esclarecida, mas análises individuais de cada cópia em plantas transgênicas indicaram que a cópia *Sw-5b* é essencial para a expressão do fenótipo de resistência (Spasova *et al.*, 2001). O *Sw-5* pertence à mesma classe de genes de resistência a que pertence o gene *Mi*, que confere resistência a espécies de *Meloidogyne*; *RPM1*, que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* e vários outros. Essa classe de genes é denominada CC-(NB-ARC)-LRR, que contém repetições ricas no aminoácido leucina e sítios de ligação de nucleotídeos altamente conservados (Hammond-Kossack & Kanyuka, 2007).

Devido a perdas econômicas causadas por tospovírus em diferentes áreas de produção ao redor do mundo, a resistência genética se tornou o foco das pesquisas relacionadas com o manejo dessa doença (Gordillo *et al.*, 2008). A natureza dominante do gene *Sw-5* permitiu o amplo uso deste locus no desenvolvimento de cultivares híbridos. Foi observado que cultivares contendo o locus *Sw-5* apresentam resistência de amplo-espectro a tospovírus, com alta estabilidade a isolados distintos de TSWV (Stevens *et al.*, 1992; Roselló *et al.*, 1998) e também às espécies relacionadas GRSV e TCSV (Boiteux & Giordano, 1993; Boiteux *et al.*, 1993). A introdução deste locus em cultivares comerciais levou a uma considerável redução nas perdas econômicas causadas por tospovírus, mesmo esta resistência tendo sido quebrada por alguns isolados e espécies (Cho *et al.*, 1996; Latham & Jones 1998; McMichael *et al.*, 2002; Aramburu *et al.*, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005), sob alta pressão de inóculo e ampla variação de temperatura (Diez *et al.*, 1995; Roselló *et al.*, 1997; Roselló *et al.*, 1998).

A natureza complexa das espécies de *Tospovirus* podem levar a ocorrência de escapes em sistemas de seleção em programas de melhoramento. Esses vírus são bem instáveis em extratos; a expressão de sintomas é altamente influenciada por condições ambientais e o uso de isolados “frescos” é necessário para evitar o acúmulo de variantes defectivas (mais atenuadas) dos isolados (Resende *et al.*, 1992; Inoue-Nagata *et al.*, 1997; Nagata *et al.*, 2000; Moritz *et al.*, 2004). Dessa forma, sistemas de seleção em larga escala para resistência a tospovírus em tomates baseados

no gene *Sw-5* poderão se beneficiar grandemente através do uso de marcadores moleculares.

Até o momento, a maioria dos marcadores moleculares disponíveis para o monitoramento da incorporação do locus *Sw-5* em linhagens suscetíveis são marcadores RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), derivados de RAPD, RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) e CAPS (*Cleaved amplified polymorphic sequence*) (Stevens *et al.*, 1995; Stevens *et al.*, 1996; Chagué *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1997; Smiech *et al.*, 2000; Czech *et al.*, 2003; Langella *et al.*, 2004). Esses marcadores complexos são proximamente ligados e podem ser ocasionalmente separados do gene de interesse através de recombinação genética (eventos de *crossing-over*). Neste caso, marcadores derivados do locus de resistência capazes de diferenciar entre plantas suscetíveis e resistentes seriam ideais (Folkertsma *et al.*, 1999; Garland *et al.*, 2005). Apesar das seqüências derivadas do locus *Sw-5* estarem disponíveis em bancos de dados públicos, existem poucos dados relacionados a marcadores moleculares derivados dos mesmos. O trabalho publicado por Garland *et al.* (2005) é uma exceção, em que se utiliza de um marcador dominante derivado do locus *Sw-5* combinado com um marcador CAPS ligado ao mesmo para a verificação de linhagens suscetíveis e resistentes a tospovírus.

Neste capítulo foi avaliado um painel de *primers* para PCR que englobam parte do locus *Sw-5* procurando-se estabelecer um sistema de identificação específico para essa região genômica. Posteriormente, procurou-se validar este marcador através da avaliação de acessos de tomate suscetíveis para o estabelecimento de sua capacidade para o monitoramento da incorporação do gene *Sw-5* em material genético de elite utilizado em programas de melhoramento.

## 2) MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1) Desenho dos *primers* e sua localização dentro do locus *Sw-5*

Sete pares de *primers* capazes de amplificar fragmentos de aproximadamente 400 a 575 pares de bases (pb) dentro do locus *Sw-5* foram desenhados (Tabela 1), baseados na seqüência dos genes *Sw-5a* e *Sw-5b* (acesso AY007366). Cada par de *primers* foi desenhado utilizando-se do programa Lasergene'99 Package (DNASar, Madison, WI). De acordo com Spassova *et al.* (2001) o gene *Sw-5* apresenta cinco cópias ao longo do cromossomo 9, nomeadas *Sw-5a* até *Sw-5e*. A parte da seqüência selecionada para a amplificação englobou uma área de alta identidade entre as cópias *Sw-5a* e *Sw-5b*, cobrindo uma região de mais de 3.000 pb. Esta região corresponde a uma seqüência derivada de uma planta de tomate resistente a TSWV (acesso AY007366) que, supostamente, expressa um padrão diretamente relacionado com resistência a tospovírus.

**Tabela 1.** Códigos, seqüências e tamanho esperado dos amplicons de um painel de *primers* derivado da seqüência do locus *Sw-5* (acesso AY007366).

Código	Seqüência	Tamanho do Amplicon
'Sw-5-1'	F* = 5'-TTTGGAGGTTTGGAGGAAGAAGAG-3' R* = 5'-TCATGTCCGACCCAATACCTAACT-3'	409 bp
'Sw-5-2'	F = 5'-AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT-3' R = 5'-TTCCGCATCAGCCAATAGTGT-3'	574 bp
'Sw-5-3'	F = 5'-GAATCTGTTTATGAGTGCGACCTT-3' R = 5'-ACACCCTCTTCTTCTCCAAACCT-3'	418 bp
'Sw-5-4'	F = 5'-TTTTGCAAGAACATCATCAGTA-3' R = 5'-GGCGAAAATCCCAACAAG-3'	538 bp
'Sw-5-5'	F = 5'-AGTCTCCAAACATTCTGCTTCTC-3' R = 5'-TTCTTTTGCCTGATTCTTAGTCG-3'	416 bp
'Sw-5-6'	F = 5'-AATTCTTTCGGTTACAA-3' R = 5'-CCGCCTCTGAATACAAAGTCGTCT-3'	496 bp
'Sw-5-7'	F = 5'-TCGCAACGTAATAAAGTCCCACAT-3' R = 5'-ACATACTTCAACAACCTAAACTCC-3'	436 bp

\*F = Forward; R = Reverse

## 2.2) Extração de DNA, ciclos de PCR e análise do gel de agarose

O DNA genômico foi purificado como descrito por Boiteux *et al.* (1999) utilizando-se do método do tampão CTAB 2X modificado com passos extras de purificação com solventes orgânicos. O DNA foi amplificado em reações de PCR como a citada a seguir: aprox. 1 µg de DNA, 1 µL de tampão para PCR 10X (Invitrogen), 0,3 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,7 µL de dNTP 2,5 mM, 100 ng de cada *primer*, 0,5 Unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água para um volume final de 10 µL. As reações foram amplificadas em um termociclador Mastercycler (Eppendorf) seguindo-se o programa: desnaturação a 94° C por 2 minutos, 29 ciclos compostos por 94° C por 30 segundos, 50° C por 1 minuto e 72° C por 30 segundos e extensão final a 72° C por 5 minutos. Todos os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% em tampão TBE.

## 2.3) Ensaio em casa de vegetação utilizando-se de linhagens quase-isogênicas para avaliar a associação entre o perfil de PCR e a resistência a *Tospovirus*.

Plantas de *S. lycopersicum* da cultivar 'Viradoro' (resistente a TSWV devido a presença do locus *Sw-5*) (Giordano *et al.*, 2000) e 'IPA-5' (linhagem quase-isogênica de 'Viradoro', suscetível a TSWV) foram utilizadas como fontes de material genético para a avaliação do painel de *primers*. Os acessos foram semeados em bandejas de isopor com 128 células, preenchidas com substrato Plantmax® e mantidas em casa de vegetação. Inoculações mecânicas com o isolado BR-01 de TSWV foram feitas em 20 plantas de cada linhagem, seguindo-se o método padronizado por Boiteux & Giordano (1993). Vinte plantas da cultivar 'Stevens' (resistente a TSWV e fonte do gene *Sw-5*) e 20 plantas da cultivar 'Moneymaker' (suscetível a TSWV) também foram inoculadas. O DNA genômico de plantas individuais de cada linhagem foi amplificado para se verificar a eficiência desses *primers* derivados do gene *Sw-5* em revelar polimorfismos.

#### **2.4) Ensaios em campo com linhagens quase-isogênicas para avaliar a associação entre o amplicon 'Sw-5-2' e resistência a tospovírus**

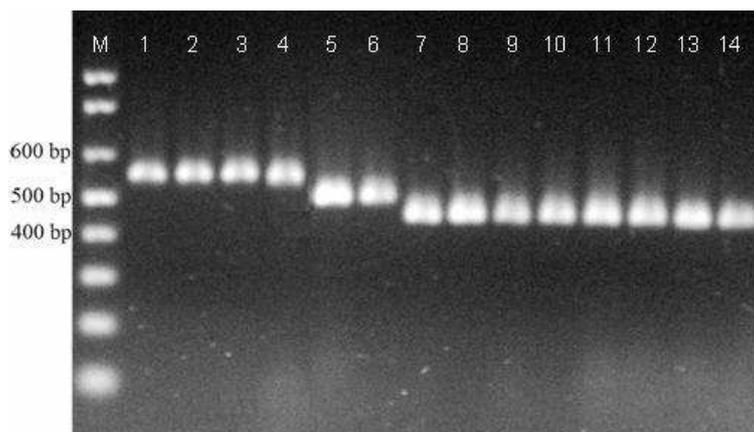
Ensaios de campo foram conduzidos para confirmações adicionais em relação aos resultados obtidos com o par de *primers* mais promissor para seleção assistida por marcadores ('Sw-5-2'). A cultivar suscetível 'Santa Clara' (Nagai, 1993) e famílias derivadas de retrocruzamentos (linhagens BC5 quase-isogênicas resistentes a tospovírus), utilizando-se de 'Santa Clara' como pai recorrente e uma linhagem desenvolvida no CNPH (Boiteux *et al.*, 1993) como doadora do locus *Sw-5*, foram simultaneamente analisadas através dos marcadores moleculares e ensaios de campo com alta pressão de inoculação de GRSV. O experimento foi conduzido na estação experimental da Embrapa Hortaliças durante a estação seca (de maio a agosto de 2008) em Brasília/DF, Brasil. Os ensaios foram compostos por 'Santa Clara' (três replicações de oito plantas cada) e 24 famílias derivadas de retrocruzamentos (oito plantas por cada família).

#### **2.5) Análise da seqüência completa dos amplicons obtidos com o par de *primers* 'Sw-5-2' de duas linhagens quase-isogênicas.**

Produtos de PCR obtidos das cultivares 'Viradoro' e 'IPA-5' foram fracionadas em gel de agarose 1%. As bandas obtidas foram recortadas do gel através do uso de luz UV e purificadas utilizando-se do QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN Inc., Valencia/CA). As bandas purificadas foram clonadas no vetor pGEM-T Easy ® (Promega, Madison, WI, USA) e sequenciadas com os *primers* SP6 e T7. A seqüência obtida foi alinhada na região definida pelo par de *primers* 'Sw-5-2' através do método Clustal/W, presente no programa Megalign (Lasergene, Madison, WI, USA).

## **2.6) Sequenciamento direto dos amplicons 'Sw-5-2' de 14 acessos de tomate**

Amplicons também foram obtidos utilizando-se do par de *primers* 'Sw-5-2' com DNA genômico extraído de 'Viradoro' e 'IPA-5' e mais 12 acessos de diferentes fundos genéticos (Figura 1). Todos os 14 acessos produziram apenas um amplicon de tamanho variável quando analisados através de eletroforese. Nesse ensaio, todos os 14 acessos foram diretamente sequenciados a partir dos produtos de PCR, utilizando-se dos *primers* 'Sw-5-2' senso e anti-senso. A reação de sequenciamento foi feita seguindo-se o protocolo do BigDye® terminator cycle sequencing versão 3.1 (Applied Biosystems of Brazil, São Paulo/SP) e 2 µl dos amplicons. O DNA foi analisado em um seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems of Brazil, São Paulo/SP) no Laboratório de Análise Genômica do CNPH. A qualidade das sequências obtidas foi verificada através do programa SeqMan (Allex, 1999). As seqüências dos 14 acessos foram alinhadas através do método Clustal presente no programa Megalign (Lasergene, Madison, WI, USA).



**Figura 1.** Perfil de amplificação de PCR em gel de agarose 1% (tampão TBE) obtido com os primers 'Sw-5-2'. Ensaios foram realizados utilizando-se de DNA genômico extraído de 14 acessos de *Solanum* (seção *Lycopersicon*). **M** = marcador 1 kb (Invitrogen); **1** = 'Stevens' (fonte do locus de resistência a tospovírus Sw-5); **2** = 'Viradoro' (contém o locus Sw-5 e é quase-isogênica a 'IPA-5'); **3** = *Solanum peruvianum* 'PI 128660' (descobriu-se como sendo resistente a isolados de tospovírus nos E.U.A.); **4** = 'Santa Clara R' (linhagem avançada tipo 'Santa Cruz' com o locus Sw-5 e quase-isogênica a 'Santa Clara S'); **5** = linhagem avançada derivada do híbrido 'Nemonetta' (suscetível a tospovírus); **6** = 'Ohio 8245' (suscetível); **7** = 'Santa Clara S' (cultivar tradicional do tipo Santa Cruz e altamente suscetível); **8** = 'Ponderosa' (cultivar de mesa muito velho e obsoleto, suscetível); **9** = 'IPA-5' (tomate para processamento, altamente suscetível); **10** = linhagem avançada derivada do híbrido 'Densus' (tomate de mesa longa-vida suscetível); **11** = 'Moneymaker' (cultivar livre de introgressões e obsoleto, suscetível); **12** = 'CNPH Tx-577' (tomate cereja suscetível); **13** = linhagem avançada suscetível derivada do híbrido 'Alambra' (tomate de mesa longa-vida); **14** = linhagem avançada suscetível derivada do híbrido 'Netta' (tomate de mesa longa-vida). O primeiro grupo de padrões de bandas de PCR (**poços 1 a 4**) geraram um amplicon de aprox. 574 pb. O segundo grupo de padrões de bandas de PCR (**poços 5 e 6**) apresentou um amplicon de aprox. 510 pb. O terceiro grupo fenotípico (**poços 7 a 14**) apresentou um amplicon de aprox. 464 pb.

### 3) RESULTADOS E DISCUSSÃO

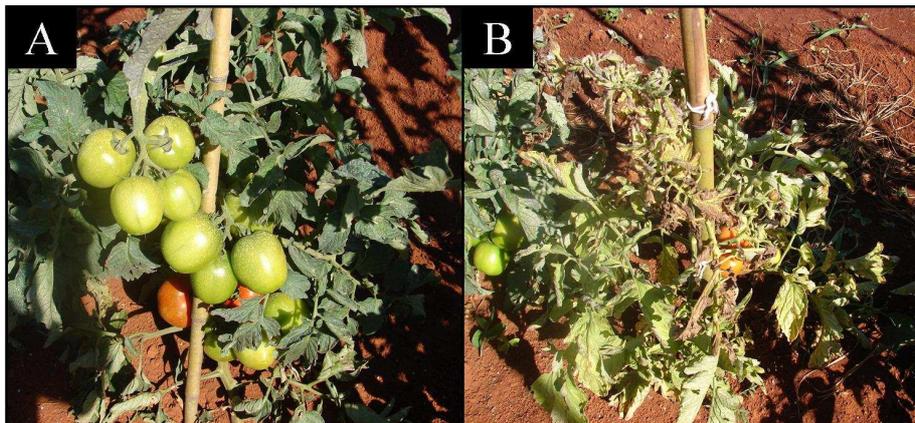
Para o monitoramento de uma região genômica responsável por uma determinada expressão de um fenótipo, os marcadores denominados "derivados do gene" ou "funcionais" (Varshney *et al.*, 2005) representam uma ferramenta robusta, já que não há riscos de separação acidental através de eventos de recombinação genética (*crossing-over*) como reportado para marcadores ligados ao gene. Até o momento, a identificação de marcadores funcionais, específicos e co-dominantes derivados exclusivamente do locus Sw-5 não estão publicamente disponíveis, apesar de que a totalidade deste foi clonada e caracterizada (Brommonschenkel *et al.*, 2000; Spassova *et al.*, 2001).

No presente trabalho, foi avaliado um painel de sete pares de *primers* (Tabela 1) derivados de informações de sequências do locus *Sw-5*, buscando estabelecer um sistema de identificação eficiente para esta região genômica. Os pares de *primers* 'Sw-5-4' e 'Sw-5-7' apresentaram um perfil de amplicons complexos, sendo um monomórfico e o outro de polimorfismo de intensidade, que eram bastante difíceis de se definir. Os perfis de amplicons complexos (com várias bandas monomórficas) podem indicar que esses *primers* não são específicos ao locus *Sw-5*, com os amplicons obtidos possivelmente correspondendo a genes relacionados à classe CC-(NB-ARC)-LRR. Essa suposição não foi corroborada por mais análises experimentais. Os outros pares de *primers* apresentaram nenhuma reação sob as condições de PCR empregadas (*primers* 'Sw-5-1', 'Sw-5-3' e 'Sw-5-6') ou um padrão monomórfico ('Sw-5-5'). Também para esses *primers* nenhuma outra análise foi realizada.

O par de *primers* 'Sw-5-2' foi o único capaz de revelar um padrão polimórfico estável entre as duas linhagens quase-isogênicas 'Viradoro' e 'IPA-5' (Figura 1, poços 2 e 9). O perfil de PCR obtido com este par de *primers* apresentou somente um amplicon, que foi capaz de discriminar de maneira confiável e estável as cultivares 'Stevens' e 'Moneymaker' (Figura 1, poços 1 e 11). 'Stevens' (fonte do gene *Sw-5*) desenvolve uma reação de resistência a TSWV (isolado BR-01) depois de inoculação mecânica sob condições de casa de vegetação. Todas as plantas de 'Moneymaker' foram consideradas suscetíveis neste ensaio. Além disso, o amplicon obtido com o par de *primers* 'Sw-5-2' foi co-dominante, indicando a existência de deleções ou inserções de cerca de 100 pares de bases (pb) nessa região.

Avaliações paralelas foram conduzidas através de PCR com os pares de *primers* 'Sw-5-2' e análise de campo a inoculações com GRSV da cultivar 'Santa Clara' ("Santa Clara S"), como controle suscetível, e suas famílias quase-isogênicas resultantes de retrocruzamentos contendo o locus *Sw-5* ("Santa Clara R"). Todas as 24 plantas nas três parcelas de "Santa Clara S" apresentaram sintomas severos de infecção por GRSV (Figura 2) confirmada através de ELISA com antisoro específico (dados não apresentados). Estes resultados indicaram uma pressão de inóculo adequada e uniforme através do campo experimental. O marcador derivado de *Sw-5* (um amplicon de

aproximadamente 574 pb) foi observado em todas as 192 plantas das 24 famílias de “Santa Clara R” quase-isogênicas (Figura 1, poço 4). No caso das plantas suscetíveis de “Santa Clara S” foi observado um amplicon menor, de aproximadamente 464 pb (Figura 1, poço 7). Uma quase completa correlação foi observada entre o resultado do marcador derivado de *Sw-5* e a resistência a GRSV sob condições de campo, exceto para duas plantas de “Santa Clara R” que apresentaram necrose apical ou manchas em anel nos frutos. A presença de uma pequena fração de plantas suscetíveis é comumente observada, mesmo em linhagens avançadas contendo o locus *Sw-5* em condições de campo no Brasil (Boiteux & Giordano, 1993). Este resultado tem sido mais justificado pela penetrância incompleta do gene *Sw-5* (Stevens *et al.*, 1992) do que pela ocorrência de variantes do vírus e/ou efeitos ambientais na expressão gênica.



**Figura 2.** Reação em ensaio de campo a infecção por *Groundnut ringspot virus* (GRSV) de (A) linhagem quase-isogênica ‘Santa Clara R’ (sem sintomas), que foi homocigota para o amplicon resistente derivado de *Sw-5* obtido após ensaios de PCR utilizando o par de *primers* ‘Sw-5-2’ e (B) linhagem derivada de retrocruzamento ‘Santa Clara S’ (apresentando necrose apical e nanismo devido a infecção por GRSV), que foi homocigota para o amplicon suscetível derivado de *Sw-5* obtido após ensaios de PCR utilizando o par de *primers* ‘Sw-5-2’. Este par de *primers* foi desenvolvido para se combinar com sequências do locus *Sw-5* (resistência a tospovírus) de tomate.

Ensaio de PCR também foram conduzidos com o par de *primers* ‘Sw-5-2’ utilizando-se DNA genômico extraído de uma coleção de 14 acessos sabidamente resistentes ou suscetíveis a isolados de tospovírus (Figura 1). As análises indicaram três “padrões de migração de DNA”. O primeiro grupo,

apresentando um amplicon de aprox. 575 pb, foi exibido por três acessos resistentes a tospovírus contendo o lócus *Sw-5* ('Stevens', 'Viradoro' e 'Santa Clara R') e um *S. peruvianum* 'PI 128660', que foi considerado resistente a isolados de TSWV na Austrália e Estados Unidos (Gordillo *et al.*, 2008). O segundo grupo apresentou um amplicon de aprox. 510 pb e correspondeu a dois acessos suscetíveis (uma linhagem avançada derivada do híbrido 'Nemonetta' e a cultivar 'Ohio 8245'). O terceiro grupo apresentou um amplicon de aprox. 464 pb e foi composto pelas duas linhagens quase-isogênicas 'IPA-5' e 'Santa Clara S' e seis outros acessos e linhagens avançadas derivadas de derivados de híbridos comerciais suscetíveis a tospovírus (Figura 1). É importante mencionar que, em todas as situações, plantas heterozigotas produziram amplicons com intensidade similar permitindo, dessa forma, um sistema baseado em marcador co-dominante confiável, especialmente em géis com maior concentração de agarose (1.4% a 1.8%) (dados não apresentados). Apesar disso, a presença de mais de um padrão para acessos suscetíveis requer a comparação com amostras de PCR derivadas de DNA extraído de fontes do lócus *Sw-5* ou uma estimativa cuidadosa do tamanho do amplicon. Esse procedimento evitará erros na classificação, como, por exemplo, a identificação de plantas "pseudo-resistentes" de populações suscetíveis a tospovírus segregando para os grupos 2 e 3 do padrão de bandas. Além disso, a ocorrência de novos padrões de bandas para suscetibilidade podem surgir, caso as amostras utilizadas sejam derivadas de acessos de tomate com fundos genéticos diferentes daqueles empregados neste trabalho.

A análise completa das seqüências dos amplicons 'Sw-5-2' clonados obtidos de 'Viradoro' (574 pb) e 'IPA-5' (464 pb) indicou uma identidade total de 81,7% com a presença de deleções e mutações de ponto, mas sem nenhuma indicação de recombinações (Figura 3). A diferença de 110 pb observada nos ensaios de géis de agarose entre as linhagens quase-isogênicas 'Viradoro'/'IPA-5' e 'Santa Clara R'/'Santa Clara S' foi causada por duas grandes deleções (83 pb no total) e outras de menor tamanho ou de apenas um nucleotídeo (31 pb no total). Vinte e sete mutações de ponto (21 transições e 6 transversões) foram observadas nos amplicons derivados de *Sw-5* (Figura 3).

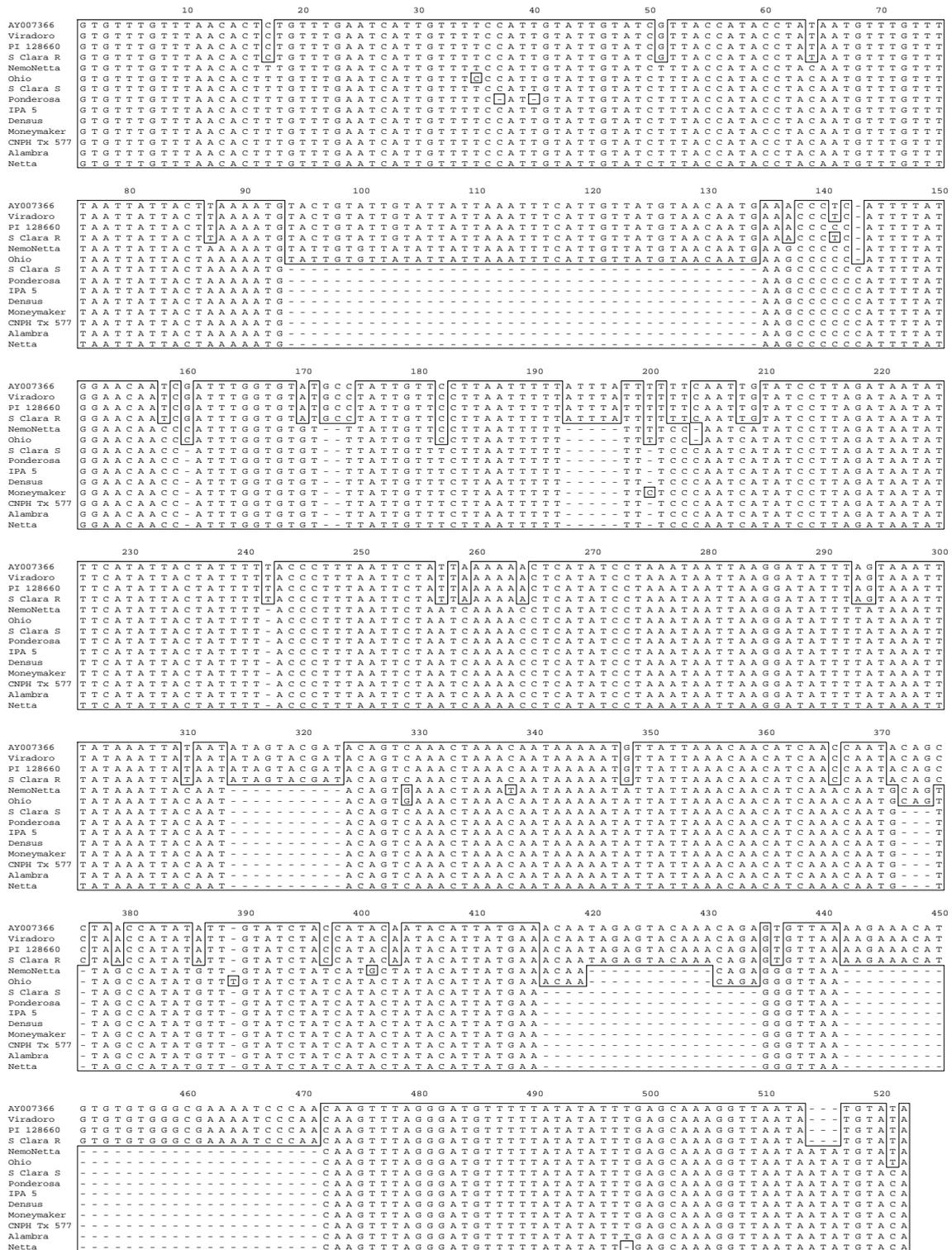


**Figura 3.** Comparação do segmento completo dos amplicons ‘Sw-5-2’ clonados obtidos de DNA genômico de *Solanum lycopersicum* das cultivares ‘Viradoro’ (574 pb) e ‘IPA-5’ (464 pb). ‘Viradoro’ é uma cultivar para processamento resistente a espécies de tospovírus devido a presença do locus *Sw-5* e ‘IPA-5’ é uma linhagem quase-isogênica de ‘Viradoro’, que é altamente suscetível a tospovírus. O par de *primers* ‘Sw-5-2’ (flanqueando as sequências) é derivado do tomate ‘Stevens’ (acesso AY007366) que é a fonte do locus *Sw-5* introgridido de *S. peruvianum*. A posição dos nucleotídeos da seqüência original AY007366 que engloba o amplicon ‘Sw-5-2’ vai dos nucleotídeos 24591 a 25162.

Amplicons de ‘Viradoro’ e ‘IPA-5’ também foram seqüenciados diretamente utilizando-se dos *primers* ‘Sw-5-2’ senso e anti-senso juntamente com os amplicons obtidos de 12 outros acessos de tomate (Figura 1). Por essa razão, a análise da seqüência foi realizada com 522 dos 574 pb dos amplicons (cerca de 91% de toda a seqüência, excluindo-se o par de *primers* ‘Sw-5-2’). Os resultados indicaram que os amplicons são específicos para o locus *Sw-5* e as diferenças de tamanho ocorrem graças a um número de inserções/deleções nessa região genômica. Um número de mutações de ponto também foram observadas (Figura 4). As seqüências das linhagens

resistentes 'Viradoro' e 'Santa Clara R' foram 100% idênticas a de 'Stevens' para essa região genômica.

É interessante notar que a região genômica dentro do locus Sw-5 que corresponde ao amplicon 'Sw-5-2' foi altamente conservada entre os dois loci de *S. peruvianum* aqui analisados (os loci derivados de 'Stevens' e de 'PI 128660'). As sequências de 'Stevens' e 'PI 128660' são praticamente idênticas com somente uma mutação de ponto (T/C) na posição 141 (Figura 4). Este nível de conservação de nucleotídeos é consideravelmente surpreendente para uma espécie auto-incompatível e alógama como *S. peruvianum*. Somente um grupo de acessos suscetíveis formados por 'Santa Clara S', 'IPA-5', 'CNPH Tx-557' e linhagens avançadas de 'Densus' e 'Alambra', tiveram 100% de identidade entre as sequências. Os outros acessos suscetíveis apresentaram níveis de identidade variando de 87.9% a 99.8%. Obviamente, não é possível até o presente momento especular que essa coleção de deleções e mutações de ponto estão diretamente ligadas a reação suscetível dos acessos pertencentes aos grupos 2 e 3 dos padrões de bandas de DNA. Para isso, seria necessária a geração de mutações em regiões do locus Sw-5 correspondentes às observadas em acessos suscetíveis para demonstrar os efeitos de perda de função.



**Figura 4.** Comparação de seqüências de amplicons obtidos com os pares de primers ‘Sw-5-2’ utilizando-se de DNA genômico extraído de 14 acessos de *Solanum* (seção *Lycopersicon*). A seqüência dos primers é derivada do tomate ‘Stevens’, fonte do locus Sw-5, introgridido de *Solanum peruvianum* (acesso AY007366). Os seguintes acessos resistentes (R) e suscetíveis (S) foram analisados: ‘Stevens’ (R); ‘Viradoro’ (R); *Solanum peruvianum* ‘PI 128660’ (R); ‘Santa Clara R’ (R); uma linhagem derivada do híbrido ‘NemoNetta’ (S); ‘Ohio 8245’ (S); ‘Santa Clara S’ (S); ‘Ponderosa’ (S); ‘IPA-5’ (S); uma linhagem derivada do híbrido ‘Densus’ (S); ‘Moneymaker’ (S); ‘CNPH Tx-577’ (S); uma linhagem derivada do híbrido ‘Alambrá’ (S) e uma linhagem derivada do híbrido ‘Netta’ (S).

Do ponto de vista da seleção assistida por marcadores, um ensaio de PCR confiável, simples e rápido para analisar a presença do locus *Sw-5* é muito desejável. Em melhoramento de tomate assistido por ferramentas moleculares, marcadores ligados ao gene *Sw-5* RFLP, RAPD, derivados de RAPD e CAPS são constantemente utilizados (Stevens *et al.*, 1995; Stevens *et al.*, 1996; Chague *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1997; Smiech *et al.*, 2000; Czech *et al.*, 2003; Langella *et al.*, 2004). Essa coleção de marcadores pode ocasionalmente ser separada do locus *Sw-5* por eventos de *crossing-over* durante o processo de melhoramento para a geração de populações e/ou incorporação deste clado em linhagens elite de tomate. Neste mérito, o marcador co-dominante 'Sw-5-2' possui mais vantagens do que todos os marcadores reportados até o momento.

O marcador aqui reportado também é considerado de uso mais simples que o marcador derivado do locus *Sw-5* desenvolvido por Garland *et al.* (2005). Neste exemplo, a habilidade para discriminar plantas resistentes homocigotas e heterocigotas depende da realização de uma digestão enzimática dos produtos de PCR. Além disso, é necessário o uso do marcador CT220 como controle positivo para se identificar plantas suscetíveis e falsos negativos (Garland *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos com o par de *primers* 'Sw-5-2' indicam uma gama de aplicações para uma ferramenta robusta de seleção para o monitoramento da introgressão do locus *Sw-5* em acessos de tomate. Por conseguir identificar claramente o locus, este marcador pode ser usado para amplificar loci análogos em outras fontes de resistência a tospovírus em *Solanum* (seção *Lycopersicon*), buscando-se isolar alelos com características potencialmente distintas, incluindo-se estabilidade térmica, melhor expressão da resistência em frutos e resistência a isolados capazes de sobrepujar o *Sw-5*. Outro uso possível deste par de *primers* seria a busca por ortólogos do gene *Sw-5* que podem estar presentes em outras espécies do gênero *Solanum*, aumentando sua potencialidade e universalidade, sendo assim usado em outros programas de melhoramento além de tomate.

## **Capítulo 5**

**Análise de cinco genes de *Tomato spotted wilt virus* como potenciais fatores de avirulência, usando como modelo biológico *Nicotiana benthamiana* transgênica expressando uma cópia funcional do gene *Sw-5* do tomateiro**

## 1) INTRODUÇÃO

Os trabalhos de Flor (1971) introduziram os conceitos da teoria gene-a-gene, demonstrando que uma cultivar de linho é resistente a uma raça fisiológica de *Melampsora lini* por conter um gene dominante de resistência que corresponde a um gene dominante de avirulência no patógeno.

Em relação à interação entre vírus e plantas, genes que codificam a replicase, proteína de movimento e a proteína do capsídeo já foram identificados como genes *Avr* (Weber *et al.*, 1993; Whitham *et al.*, 1994; Bendahmane *et al.*, 1995; Gilardi *et al.*, 1998; Brommonschenkel *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001; Spassova *et al.*, 2001; Lovato *et al.*, 2008).

Para superar este mecanismo de reconhecimento, mutações em aminoácidos que compõem esses genes virais, mas que não chegam a afetar significativamente o mecanismo de patogenicidade, podem ocorrer. Essa quebra da resistência caracterizada por esse mecanismo de reconhecimento já foi comprovada em diversos cultivos de grande importância econômica e a caracterização e o mapeamento de novos genes *R*, principalmente para espécies cultivadas de Solanáceas, foi realizado de maneira extensiva (Grube *et al.*, 2000; Gebhardt *et al.*, 2001).

A maioria da resistência amplamente utilizada em um contexto mundial, referente aos plantios comerciais, é dominante e geralmente monogênica. Grande parte deste grupo, que chegou a ser caracterizado molecularmente, confere resistência a bactérias ou fungos (Hammond-Kosack & Parker, 2003). Essa resistência é caracterizada pela ocorrência de reação de hipersensibilidade (HR) no sítio de entrada do patógeno macroscopicamente observada como o surgimento de lesões locais necróticas seguida de abscisão foliar (Heath, 2000). As células mortas no sítio de infecção podem restringir o movimento do patógeno ou servem como reservatório de compostos antimicrobianos como fitoalexinas sintetizadas por células que circundam a lesão. Ocorre também a deposição de calose, lignina, glicoproteínas e o acúmulo de outras proteínas relacionadas com a patogênese resultando na limitação da movimentação a curta e a longa distância por parte do vírus (Collinge & Slusarenko, 1987; Keppler & Baker, 1989; Bol *et al.*, 1990; Bostock & Stermer, 1990).

Na última década, vários genes de resistência e seus correspondentes de avirulência foram clonados, por exemplo, os genes *RTM1/RTM2* e *HRT* em *Arabidopsis*, que conferem resistência a *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Turnip crinckle virus* (TCV), respectivamente (Cooley *et al.*, 2000) e os genes *Tm-2<sup>2</sup>* e *Sw-5* em tomate, que conferem resistência a *Tomato mosaic virus* (ToMV) e TSWV, respectivamente (Weber *et al.*, 1993; Brommonschenkel *et al.* 2000, Spassova *et al.*, 2001; Lanfermeijer *et al.*, 2003).

Dentre as famílias de genes de resistência que causam reações de hipersensibilidade a mais numerosa é a denominada NBS-LRR. Os genes de resistência classificados dentro dessa família possuem características comuns, de acordo com os domínios das proteínas sintetizadas (Van Bentem *et al.*, 2005). O domínio NBS (*nucleotide binding site*) corresponde a um sítio de ligação de nucleotídeos e o domínio LRR (*leucine rich repeat*) está envolvido na regulação de atividade sinalizadora das proteínas de resistência, localizando-se na região C-terminal (Huang & Williamson, 2003). Ainda ocorrem os domínios TIR ou CC (*coiled-coil*) na região N-terminal (Dangl & Jones, 2001; Martin *et al.* 2003).

O gene *Sw-5* é membro da família de genes CC-NBS-LRR. Este gene confere resistência do tipo dominante de amplo espectro aos *Tospovirus* (família *Bunyaviridae*): *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e seu modo de ação segue as descrições referentes à definição dos genes pertencentes a essa classe de genes *R* (Boiteux & Giordano, 1993; Brommonschenkel *et al.*, 2000; Spassova *et al.*, 2001). Pesquisas que visam compreender a interação entre genes de resistência a TSWV e seu componente de avirulência foram realizados anteriormente em alguns membros dessa classe de genes como *Sw-5* e *Tsw* (originário de *Capsicum chinense*) e que também apresenta reação de hipersensibilidade a infecção por tospovírus (Boiteux & de Ávila, 1994; Boiteux, 1995; Hoffmann *et al.*, 2001; Margaria *et al.*, 2007; Lovato *et al.*, 2008). No caso do gene *Tsw*, a expressão do gene de avirulência parece estar localizada no componente S, que contém os genes NSs, que sintetiza uma proteína não estrutural e que está envolvida com a supressão do silenciamento gênico e N, que sintetiza a proteína do capsídeo (Lovato *et al.*,

2008). Para o gene *Sw-5*, Hoffmann *et al.* (2001) verificaram, através do uso de isolados recombinantes, que o gene de avirulência desta interação está localizado no componente M, que contém o gene *N<sub>Sm</sub>*, que sintetiza a proteína de movimento; e o precursor das glicoproteínas *G<sub>c</sub>* e *G<sub>n</sub>* que recobrem o envelope lipídico e são responsáveis pela interação tospovírus/inseto vetor (Bandla *et al.*, 1998). Portanto, esses genes apresentam-se como possíveis candidatos para o estudo dos mecanismos envolvidos na interação de *Sw-5* com os genes de tospovírus.

A compreensão destes mecanismos pode contribuir para o entendimento dos processos de geração dos isolados capazes de superar a resistência baseada em *Sw-5* no campo, por exemplo. Isolados de TSWV com a habilidade para superar a resistência conferida por este gene já foram relatados em cultivos de tomate resistentes da região mediterrânea e África do Sul (Thompson & Van Zijl, 1996; Aramburu & Marti, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005). A capacidade de multiplicação no inseto vetor e a composição de seu genoma tripartido podem potencialmente conferir aos vírus da família *Bunyaviridae* a geração de novos isolados, a partir de eventos de recombinação de segmentos inteiros de seu genoma (Hoffmann *et al.*, 2001). Considerando esse potencial de adaptação, a possível manipulação da resistência para a criação de alternativas duráveis e específicas depende essencialmente do entendimento das interações patógeno/hospedeira.

Para a observação dessas interações, novas ferramentas devem ser desenvolvidas. Lau *et al.* (2006) testaram a capacidade de reconhecimento de fatores do patógeno em plantas de tabaco selvagem da espécie *Nicotiana benthamiana* transformadas com o gene *Sw-5*. Esse modelo biológico mostrou-se funcional, apresentando o mesmo espectro de resistência do locus *Sw-5* em tomate com reações de hipersensibilidade que impediram a infecção sistêmica dos inóculos de TCSV, GRSV e CSNV (de forma variável). Spassova *et al.* (2001) demonstraram a eficiência da plataforma transgênica baseada em *Sw-5* ao transformar plantas de *Nicotiana tabacum* com este locus. A partir dessa plataforma, foi possível demonstrar que a cópia *Sw-5b* do locus era suficiente para conferir resistência a tospovírus.

No presente trabalho, a interação do gene *Sw-5* com as proteínas individuais de TSWV (*N*, *N<sub>ss</sub>*, *N<sub>sm</sub>*, *G<sub>c</sub>* e *G<sub>n</sub>*) foi estudada através do uso de

um modelo biológico baseado em plantas de *N. benthamiana* transgênicas expressando a cópia funcional do gene *Sw-5*. O entendimento dessas interações visa fornecer subsídios para o estudo dos genes virais e dos mecanismos envolvidos na quebra de resistência do gene *Sw-5* no campo por isolados de tospovirus.

## 2) MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1) Construção de vetores para expressão transiente

Para a obtenção das construções dos vetores contendo os genes N, Nss e Nsm dos isolados BR01 e GRAU (que supera a resistência do gene *Sw-5*) de TSWV, reações de RT-PCR utilizando-se *primers* específicos para cada um dos genes foram realizadas. Primeiramente, o RNA total foi extraído das folhas inoculadas e sistêmicas usando Trizol (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os protocolos de manipulações seguintes de material genético extraído seguiram as recomendações de Sambrook *et al.* (1989).

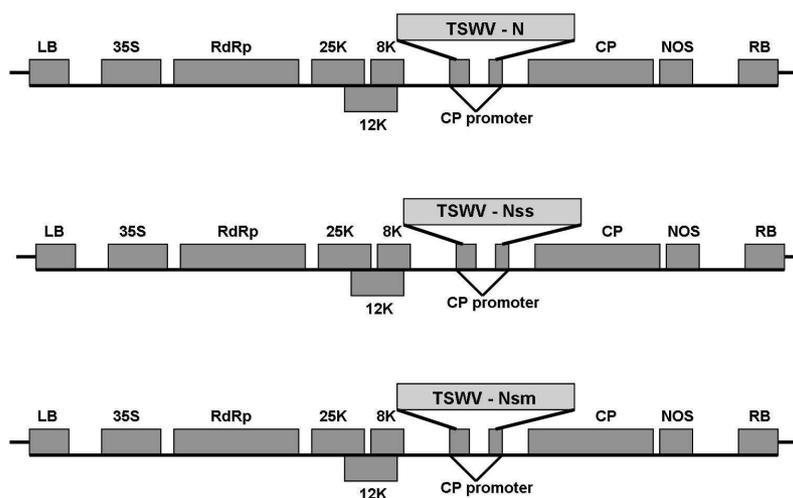
Em seguida, a síntese de cDNA para cada RNA purificado foi realizada, utilizando-se de *primers* anti-senso (Tabela 1). A retro-transcrição se deu mediante o uso da transcriptase reversa MMLV-RT (Invitrogen) adicionada a 100-500 ng de RNA, seguindo as recomendações do fabricante para a síntese de cDNA. As reações foram então mantidas a 37° C por 1 hora.

**Tabela 1.** Lista de *primers* utilizados para a amplificação dos genes N, Nss e Nsm de TSWV para a montagem das construções em PVX

Gene	Primer	Orientação	Sequência
N	NTSWV1	Senso	5' CCCATCGATATGTCTAAGGTTAAGCTC 3'
	NTSWV2	Anti-senso	5' CCCGTCGACTTCAAGCAAGTTCTGCGAG 3'
Nss	NssTSWV1	Senso	5' CCCCCATGGATCGATGTCTTCAAGTGTT 3'
	NssTSWV2	Anti-senso	5' CCCGTCGACTTATTTTGATCCTGAACG 3'
Nsm	NsmTSWV1	Senso	5' CCCGTTTTAAACATCGATATGTTGACTCTTTTCG 3'
	NsmTSWV2	Anti-senso	5' CCCGTCGACACTATATTTTCATCAAAG 3'

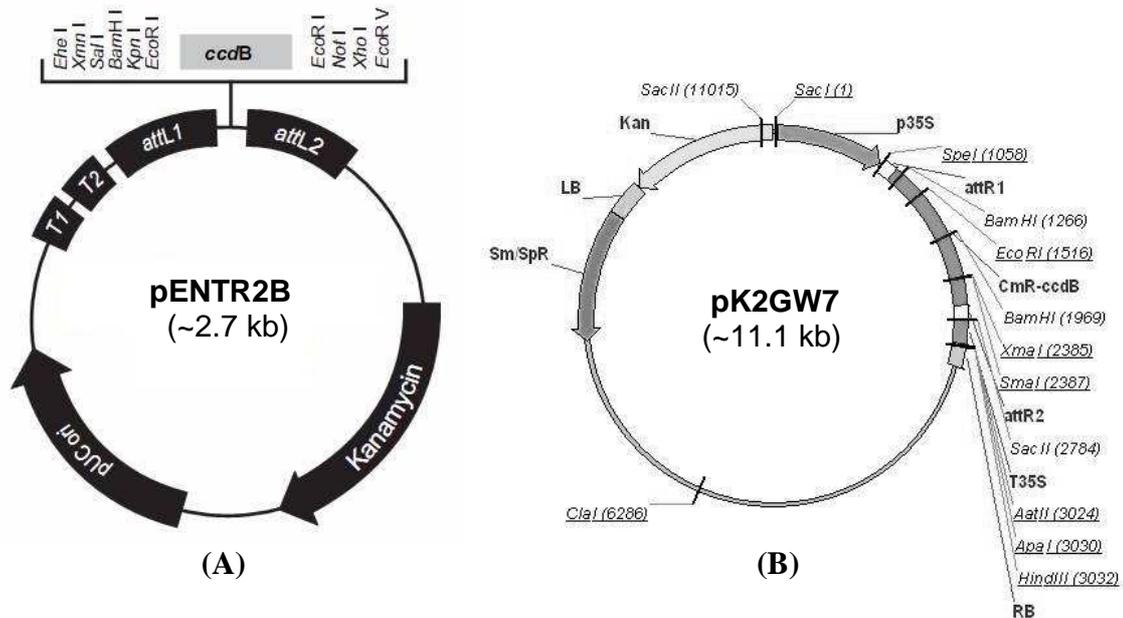
Os *primers* utilizados anteriormente e os de sentido viral (Tabela 1) foram aplicados em reações de PCR contendo os cDNAs previamente sintetizados nas seguintes proporções: 2 µl de cDNA, 5µl de tampão 10X Platinum High-Fidelity DNA polymerase (Invitrogen), 4 µl de dNTP 2,5 mM, 0,8 µl de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 ng de cada *primer*, 0,25 U de Platinum High-Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen) e água para um volume final de 50 µl. Todas as reações foram realizadas em um termociclador Mastercycler (Eppendorf) seguindo-se o programa: 5 minutos a 94° C para desnaturação e 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto.

Estes produtos de PCR foram clivados com as enzimas de restrição *ClaI* e *SaI*, fragmentados em gel de agarose 1% e purificados utilizando-se um kit comercial (Sephaglass Band Prep Kit, Amersham/Bioscience) antes da ligação em vetor PVX pgR107 (Jones *et al.*, 1999) previamente digerido com as mesmas enzimas. Esse vetor foi usado para a clonagem dos genes que codificam as proteínas N, NSs e NSm, conforme esquematizado na Figura 1. A orientação correta dos fragmentos no vetor foi verificada através de sequenciamento automático dos clones. Os plasmídeos recombinantes foram mantidos em *Escherichia coli* cepa DH5α em meio contendo antibiótico canamicina (50µg/mL) e purificado através do método da lise alcalina, sendo subsequentemente usados para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. Estas células bacterianas foram colocadas em estufa à 28° C em placas contendo meio sólido LB com antibiótico canamicina na concentração citada anteriormente. Os clones foram selecionados a partir de PCR de colônias utilizando-se dos *primers* específicos e digestão com as enzimas *ClaI* e *SaI*.



**Figura 1.** Representação esquemática das construções em pgR107 com três genes de *Tomato spotted wilt virus* (N, Nss e Nsm). **LB** = Borda esquerda de *Agrobacterium tumefaciens*; **35S** = promotor de transcrição do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); **RdRp** = RNA polimerase dependente de RNA do *Potato virus X* (PVX); **25K**, **12K** e **8K** = proteínas de movimento do PVX; **CP promoter** = promotor do gene da capa protéica do PVX; **CP** = proteína da capa do PVX; **Nos** = terminador de transcrição do gene nopalina sintase; **RB** = borda direita de *A. tumefaciens*.

Para a preparação das construções contendo os genes Gc e Gn de TSWV BR-01, os precursores dessas glicoproteínas, previamente clonados em pMON999 por Ribeiro *et al.* (2008), foram digeridos com a enzima *Bam*HI, ligados ao vetor de entrada pENTR2B previamente preparado seguindo-se a recombinação em vetor de destino pK2GW7 utilizando-se do Gateway® Cloning Technology, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen) (Figura 2). Estes genes estavam ligados ao gene da proteína YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) usado como gene marcador. Para a verificação da orientação dos insertos, realizou-se a digestão das construções com a enzima *Eco*RV.



**Figura 2.** Vetores do sistema Gateway® utilizados nesse experimento, pENTR2B (A) (vetor de entrada) e pK2GW7 (B) (vetor de destino). (A) T1 e T2 = seqüências terminadoras da transcrição; attL1 e attL2 = sítios de recombinação específica do vetor de entrada; ccdB = gene tóxico para seleção negativa; Kanamycin = gene de resistência a canamicina; pUC ori = gene de origem da replicação para manutenção do plasmídeo; (B) LB = borda esquerda de *Agrobacterium tumefaciens*; Kan = gene de resistência a canamicina; p35S = promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); attR1 e attR2 = sítio de recombinação específica do vetor de destino; CmR-ccdB = gene tóxico para seleção negativa; T35S = terminador de transcrição; RB = borda direita de *A. tumefaciens* (modificada de <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals> em 30/03/3009).

## 2.2) Utilização de *N. benthamiana* transgênica em ensaios de expressão transiente e efeito de proteínas virais

Plantas de *N. benthamiana* foram transformadas seguindo o método adotado por Spassova *et al.* (2001) para a obtenção de plantas de tabaco capazes de expressar as cópias do gene *Sw-5b* derivado de tomate da cultivar 'Stevens'. Para se comprovar a ocorrência de reações de hipersensibilidade nessas plantas induzidas por TSWV, inoculações foram realizadas utilizando-se a espécie tipo TSWV, isolado BR-01 originário do Brasil (de Ávila *et al.*, 1993); isolado GRAU, originário da Espanha (Aramburu & Marti, 2003) e JF1, originário da África do Sul (Thompson & Van Zijl, 1996). Os dois últimos são capazes de quebrar a resistência conferida por *Sw-5* em condições de campo. Todos os isolados foram mantidos em plantas de *N. benthamiana* não-transformadas e foram somente usados em até três

passagens via inoculação mecânica, evitando-se a possível geração e o acúmulo de partículas defectivas interferentes que poderiam afetar os resultados finais, atenuando os sintomas em plantas infectadas (Resende *et al.*, 1991).

Trinta plantas de *N. benthamiana* transformadas e trinta não-transformadas foram inoculadas mecanicamente utilizando-se vinte plantas para cada isolado. O extrato de *N. benthamiana* infectada foi diluído na proporção 1:10 em tampão 10 mM de fosfato de sódio pH 7.0 contendo 1% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. As plantas foram pulverizadas com carborundum e inoculadas duas vezes em um intervalo de dois dias para se evitar escapes, seguido de observação diária de sintomas até o surgimento de reações locais de hipersensibilidade ou sintomas sistêmicos (cerca de 10 a 15 dias).

Os experimentos foram realizados em casas de vegetação climatizadas pertencentes ao conjunto de estufas UNIFARM, que faziam parte da Universidade de Wageningen, Holanda. Todas as manipulações de material transgênico seguiram as regras impostas pelas autoridades holandesas (VROM/COGEM).

### **2.3) Expressão transiente de construções contendo individualmente os genes N, Nss, Nsm, Gn e Gc de TSWV mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

A verificação do fator de avirulência da interação TSWV/Sw-5 foi realizada através do ensaio de expressão transiente por *A. tumefaciens*, como descrito por Johansen & Carrington (2001). Todas as construções foram transformadas em *A. tumefaciens* linhagem 'GV3101' em 3 mL de meio líquido LB3 (para um litro: 10 gramas de triptona; 5 g de extrato de levedura; 4 g de NaCl; 1 g de KCl; 3 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) contendo antibióticos apropriados para cada vetor (PVX: 100 µg/mL kanamicina; 20 mg/mL tetraciclina / pK2GW7: 250 µg/mL spectinomicina; 20 µg/mL rifampicina) e foram mantidas *overnight* a 28° C sem iluminação. Após o período estipulado, 600 µl da cultura foram transferidos para 3 mL de meio de indução (para um litro: 10.5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4.5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.0 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.5 g de

citrato de sódio; 0.25 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.2% (p/v) de glicose; 0.5% (p/v) de glicerol; 150  $\mu M$  de acetosiringona; MES 10 mM pH 5.6) e mantidas novamente à 28° C *overnight*. O próximo passo foi centrifugação a 3300 RPM e ressuspensão em solução MS (30 g/litro de sacarose e 40 g/litro de MS pH 5.7) contendo acetosiringona 150  $\mu M$  e MES 10 mM e leitura em espectrofotômetro regulado para  $OD_{600}$ , diluindo-se a suspensão até obtenção de leitura igual a 0.5. Esta foi usada para infiltração de plantas de *N. benthamiana* no estágio de 5 a 6 folhas, sendo regadas cerca de duas horas antes para a ocorrência de abertura dos estômatos para uma maior eficiência durante o processo de infiltração. A infiltração das plantas foi realizada com uma seringa de 10 mL sem a agulha, diretamente sobre a face abaxial de todas as folhas. Após as infiltrações, todas as plantas foram mantidas em câmaras com temperatura e iluminação controladas.

Para a montagem do experimento, um lote de oito plantas para cada vetor foi preparado (quatro transformadas e quatro não-transformadas), sendo um lote para infiltração com as construções feitas com PVX e os genes de TSWV isolado BR-01, um segundo lote de plantas para infiltração com as construções de PVX e genes de TSWV isolado GRAU e um terceiro lote para pK2GW7 contendo as glicoproteínas Gc e Gn do isolado BR-01. Duas plantas foram separadas em cada lote para que uma fosse infiltrada somente com vetores (PVX) e somente com a solução tampão usada na infiltração. Foram realizadas pelo menos duas repetições para cada infiltração.

#### **2.4) Análise da expressão transiente**

A análise da expressão das proteínas foi feita através de observação diária de sintomas, buscando-se identificar reações de hipersensibilidade, e através de Western blots das folhas inoculadas (para ambos os vetores) e folhas sistêmicas (somente para PVX) a partir de dois dias após as infiltrações. Para comprovação da integridade das construções, reações de RT-PCR utilizando-se de *primers* específicos para cada gene (Tabela 2) foram realizadas a partir de RNA total extraído das folhas inoculadas e das folhas apicais não-inoculadas (infecção sistêmica) usando Trizol (Invitrogen),

seguindo-se as recomendações do fabricante. As manipulações seguintes de material genético extraído seguiram os protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

**Tabela 2.** *Primers* específicos para regiões dos genes N, Nss e Nsm de TSWV utilizados para a verificação da presença dos insertos em construções de PVX infiltradas em plantas de tabaco expressando o gene *Sw-5*.

Gene	Primer	Orientação	Sequência
N	J060	Senso	5' CATGGATCCTGCAGAGCAATTGTGTCA 3'
	J064	Anti-senso	5' CTTTGCTTTTCAGCACAGTGCA 3'
Nss	P035	Senso	5' GGCAGGAGACAAAACC 3'
	HAF75	Anti-senso	5' CATATGTCTTCAAGTGTTTATGAGTCG 3'
Nsm	Zup051	Senso	5' GGGAATTCTTTTCGGTAACAAGAGGCC 3'
	Zup023	Anti-senso	5' CCCTTCTGACTCTGTGATG 3'

Para a técnica de Western blot, extratos totais de proteínas das amostras foram desnaturados através de aquecimento por 5 minutos a 95° C e separados em gel SDS-PAGE descontínuo (Laemmli, 1970) e eletrotransferidos para membranas de PVDF. Em seguida, as membranas foram bloqueadas em 2% de leite em pó diluído em PBS. Para a detecção das proteínas de TSWV expressas pelos vetores PVX agroinfiltrados, essas membranas passaram por um processo de incubação *overnight* com anticorpos policlonais específicos (1 µg/mL) para cada proteína viral testada. A visualização foi possível através do uso de conjugados da enzima fosfatase alcalina e IgG anti-coelho (1 µg/mL), também diluídos em PBS, com posterior adição de substrato NBT/BCIP.

### 3) RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1) Utilização de *N. benthamiana* transgênica para ensaios de expressão transiente e efeito de proteínas virais

As plantas de *N. benthamiana* transformadas com o gene *Sw-5* derivado de tomate foram avaliadas em relação à sua capacidade de gerar reações de hipersensibilidade. Todas as plantas de *N. benthamiana* apresentaram esse tipo de lesão local quando inoculadas mecanicamente com o isolado BR-01, cerca de dois dias pós-inoculação, sem apresentar infecção sistêmica (Figura 3). A indução de reações típicas de hipersensibilidade demonstrou que essas plantas expressam o tipo de resistência característica do gene *Sw-5* e de outros genes da família NBS-LRR (Brommonschenkel *et al.*, 2000; Spassova *et al.*, 2001). A quebra dessa resistência foi demonstrada através do uso dos isolados JF1, originário da África do Sul e GRAU, originário da Espanha. Estes isolados foram detectados em infecções de campo e já tiveram sua capacidade de superação da resistência mediada por *Sw-5* previamente comprovada em cultivares de tomate contendo este gene de resistência ampla a tospovírus (Thompson & Van Zijl, 1996; Latham & Jones, 1998; Aramburu & Marti, 2003; Ciuffo *et al.* 2005). Todas as plantas inoculadas com esses isolados apresentaram sintomas típicos de infecção local e sistêmica causada por tospovírus (Figura 4).



**Figura 3.** Reação de hipersensibilidade observada em folhas de *Nicotiana benthamiana* transformadas com o gene *Sw-5b* de tomate após inoculação mecânica com o isolado BR-01 de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).



**Figura 4.** Sintomas típicos de infecção sistêmica causada por *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em *Nicotiana benthamiana* transgênica expressando o gene *Sw-5b* após inoculação mecânica com o isolado JF1, capaz de quebrar a resistência conferida por este gene.

Considerando que o modelo biológico utilizando *N. benthamiana* transgênica foi capaz de reproduzir com fidelidade as reações que ocorrem em condições naturais, simulando a reação de tomates resistentes quando

infectados por TSWV, estas plantas foram utilizadas nos experimentos subsequentes de expressão transiente. Nesses ensaios, foram testados os genes de TSWV expressos de forma independente via construções com o vetor PVX pgR107 (genes N, NSs e NSm) ou vetor binário (genes Gn e Gc), via agroinoculações.

A reprodução dos sintomas esperados de hipersensibilidade quando o isolado BR-01 foi inoculado, demonstrou a validação dessa plataforma para estudos das interações entre genes de tospovírus e a resistência de hospedeiros desses patógenos. Modelo semelhante já foi testado em plantas transgênicas de fumo expressando diferentes cópias do gene *Sw-5* (Spasova *et al.*, 2001), ou todo o locus (Lau *et al.*, 2006). Estes experimentos demonstraram que as plantas transformadas foram resistentes à infecção por espécies de tospovírus, assim como observado em variedades de tomate contendo o locus de resistência. O modelo baseado em *N. benthamiana* apresenta vantagens sobre outros, principalmente pela facilidade de manipulação dessa espécie comprovadamente suscetível à infecção por várias espécies virais. Os resultados aqui apresentados com esta plataforma contendo a cópia funcional de *Sw-5* constituem uma contribuição importante para o estudo de espécies de tospovírus e relações com hospedeiros que podem vir a expressar este gene.

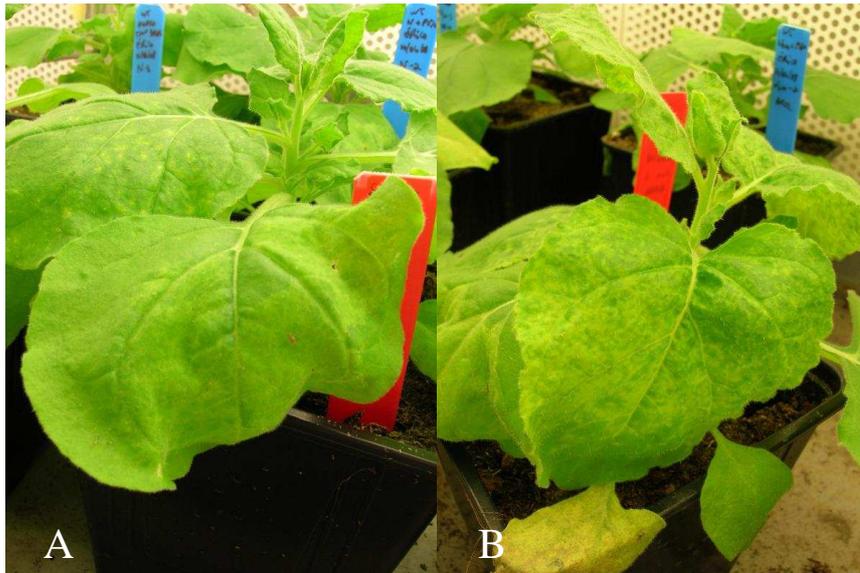
Considerando-se que algum dos genes em estudo nesse trabalho fosse responsável pela reação de avirulência, reações claras de hipersensibilidade eram esperadas, devido à fidelidade do modelo em reproduzir reações fenotípicas observadas em infecções naturais por tospovírus.

### **3.2) Expressão transiente de construções contendo individualmente os genes N, Nss, Nsm, Gn e Gc de TSWV mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

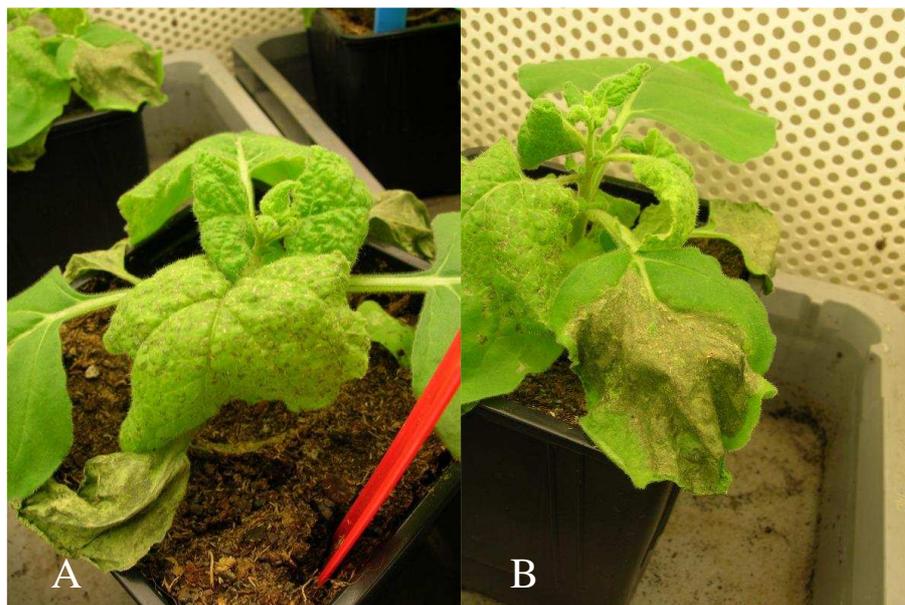
Após a comprovação do modelo baseado em *N. benthamiana* transgênica como sistema biológico adequado para o estudo das interações vírus/hospedeiro, este foi utilizado em avaliações de vários genes de TSWV e suas interações com o gene *Sw-5*. A indução da reação de hipersensibilidade

foi testada através de agroinfiltrações com as construções de PVX com os genes N, Nss e Nsm do isolado BR-01 e do isolado GRAU (que supera a resistência mediada por Sw-5) e construções com os genes Gc e Gn do isolado BR-01 no vetor binário pK2GW7. Nenhuma reação de hipersensibilidade nas folhas das plantas de *N. benthamiana* transgênica agroinfiltradas com as construções de PVX contendo os genes N e Nsm pode ser detectada, observando-se somente sintomas típicos de PVX (Figura 5). No entanto, um aumento significativo na intensidade dos sintomas causados por PVX pode ser observado nas plantas transgênicas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções PVX+Nss (Figura 6). Isso sugere que houve supressão do mecanismo de silenciamento gênico proporcionada pelo gene Nss presente na construção. A expressão isolada do gene Nss mostrou-se ativa, comprovando a função supressora dessa proteína conforme demonstrado em trabalhos anteriores (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003).

Esta supressão parece favorecer uma maior capacidade de replicação do PVX, resultando em sintomas mais intensos e severos se comparados à infecção apenas com este vírus. Esta reação também foi observada por Lovato *et al.* (2008) em experimentos relacionados com a identificação do fator de avirulência da interação TSWV/gene *Tsw* em *C. chinense*, utilizando-se do mesmo sistema baseado na expressão de Nss via PVX.

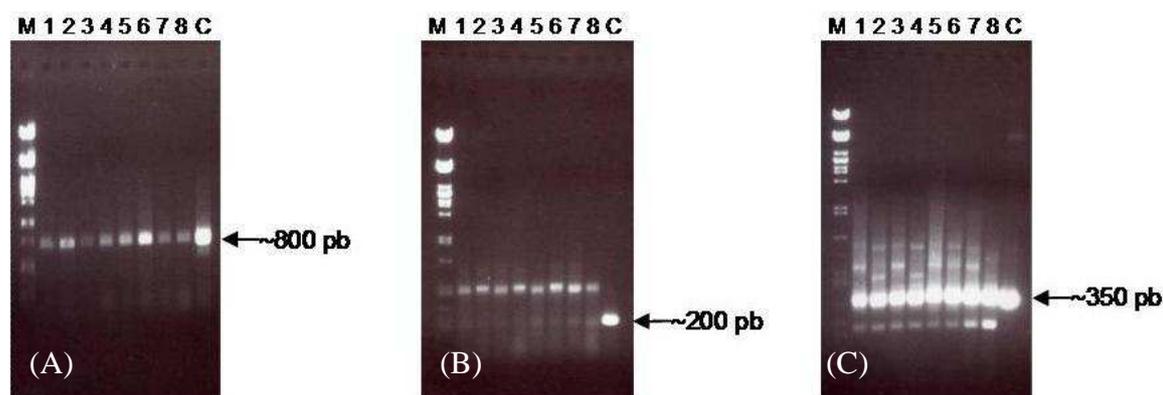


**Figura 5.** Plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* transformadas com o gene Sw-5 que confere resistência a tospovírus, agroinfiltradas com construções do vetor PVX contendo o gene N (PVX + N) (**A**) e o gene Nsm de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (PVX + Nsm) (**B**) apresentando somente sintomas típicos de infecção por PVX sem a ocorrência de reações de hipersensibilidade.



**Figura 6.** *Nicotiana benthamiana* transgênica transformada com o gene Sw-5 que confere resistência a tospovírus (**A**) e planta não-transformada (**B**) agroinfiltradas com construções do vetor PVX contendo a proteína Nss (PVX + Nss) de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Observa-se a expressão intensificada de sintomas de PVX nos dois tipos de plantas.

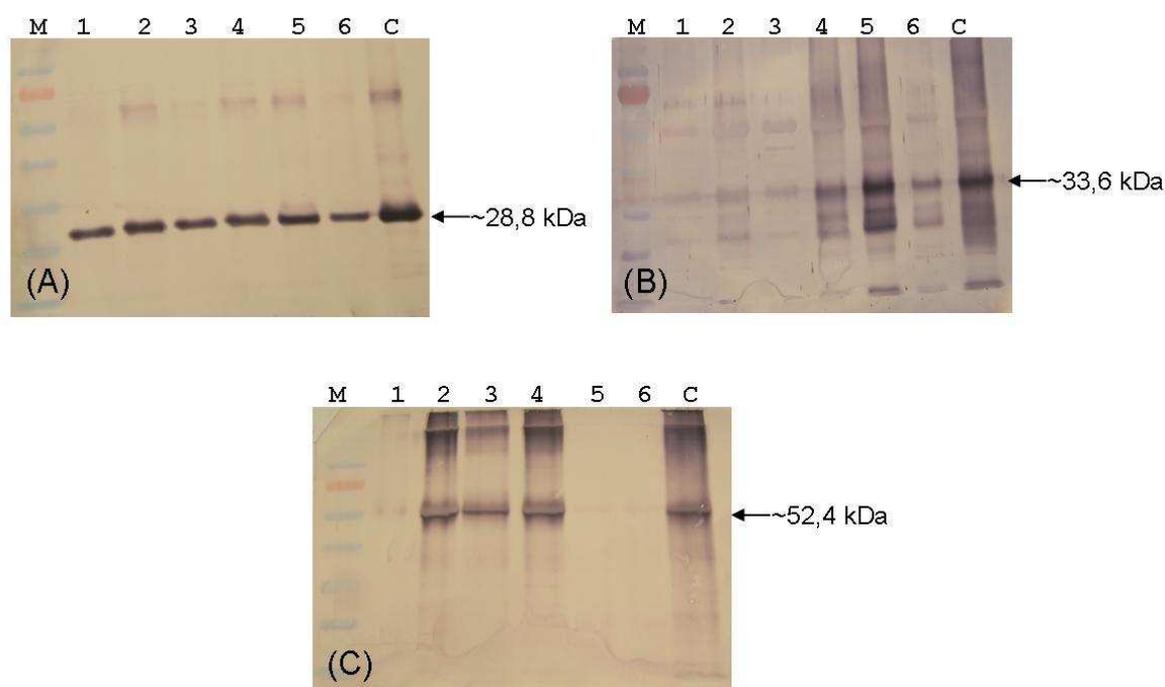
Considerando-se que o vetor PVX em algumas circunstâncias pode apresentar instabilidade na expressão de proteínas heterólogas, eliminando o gene recombinante (Ziegler *et al.*, 2000; Uhde *et al.*, 2005; Lacorte, 2006), a presença e a integridade dos insertos nas construções após as agroinfiltrações foi analisada. O RNA de amostras das folhas inoculadas e sistêmicas foi extraído e utilizado em reações de RT-PCR com *primers* específicos para os genes N, Nss e Nsm. As análises das amplificações em géis de agarose 1% mostraram a presença de bandas no tamanho esperado, correspondentes ao controle positivo. Tanto em folhas inoculadas como em folhas sistêmicas houve amplificação dos genes virais inseridos no vetor PVX, indicando que os insertos (genes de TSWV isolado BR-01) foram mantidos intactos quando agroinfiltrados nas plantas de *N. benthamiana* analisadas (Figura 7).



**Figura 7.** Análise da transcrição das construções PVX + gene N (A), PVX + Nsm (B) e PVX + Nss (C) de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em gel de agarose 1% via RT-PCR com primers específicos para essas regiões genômicas. **M** = Marcador Lambda PST-I. **Linhas de corrida 1, 3, 5 e 7** = Folhas agroinfiltradas de plantas de *N. benthamiana* transgênicas. **Linhas de corrida 2, 4, 6 e 8** = Folhas sistêmicas de *N. benthamiana* transgênicas. **C** = Controle positivo – RNA de TSWV isolado BR-01. As setas destacam as bandas nas alturas esperadas para cada par de *primers*.

Além das análises da integridade dos transcritos, a expressão das proteínas dos genes dos isolados de TSWV usados no experimento foi monitorada via Western Blots, utilizando-se anticorpos específicos para os genes N, Nss e Nsm. Os resultados demonstraram que tanto em folhas inoculadas quanto em folhas sistêmicas (aproximadamente 10 dias pós-

infiltrações) os genes contidos nas construções em PVX foram expressos corretamente, excluindo-se o gene Nss do isolado GRAU (Figura 8). A não-expressão do vetor PVX recombinante e/ou a expressão em baixa concentração contendo o gene Nss do isolado GRAU poderia indicar uma instabilidade intrínseca a esse modelo que já foi relatado para outras proteínas virais utilizando-se o mesmo sistema de expressão (Ziegler *et al.*, 2000; Uhde *et al.*, 2005; Lacorte, 2006). Plantas não inoculadas apresentaram resultados negativos para todos os antissoros testados (dados não mostrados).



**Figura 8.** Análise em Western Blots da expressão dos genes das proteínas N (A), Nsm (B) e Nss (C) de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em *Nicotiana benthamiana* infiltradas com construções usando o vetor PVX. **Linhas de corrida 1 e 2** = Isolado BR-01 em folha agroinfiltrada (1) e sistêmica (2) de *N. benthamiana* transgênica transformada com o gene de resistência a tospovirus *Sw-5*; **Linhas de corrida 3 e 4** = Isolado BR-01 em folha agroinfiltrada (3) e sistêmica (4) de *N. benthamiana* não-transgênica; **Linhas de corrida 5 e 6** = Isolado GRAU em folha agroinfiltrada (5) e sistêmica (6) de *N. benthamiana* transgênica; **C** = TSWV - isolado BR-01. As setas apresentam o tamanho esperado em gel para cada proteína.

Como observado nas inoculações com os genes N, Nss, Nsm e o controle positivo correspondendo ao isolado BR-01 de TSWV, as construções contendo isoladamente os genes Gc e Gn, também não induziram reação

visível de hipersensibilidade nas plantas de *N. benthamiana* transgênicas, mesmo quando ambas as construções foram infiltradas simultaneamente. Hoffmann *et al.* (2001) verificaram através de isolados recombinantes que o RNA M de TSWV pode conter o gene *Avr* da interação TSWV/*Sw-5*. No entanto, Através dos resultados aqui relatados, o gene *Nsm*, e os precursores das glicoproteínas, ambos codificados pelo RNA M, não foram capazes de induzir isoladamente as reações típicas de hipersensibilidade. Os mesmos resultados foram observados nas análises das proteínas N e Nss, codificadas pelo RNA S.

Novas estratégias devem ser adotadas utilizando por exemplo, combinações das construções que foram produzidas neste trabalho, visando avaliar o efeito aditivo desses genes na indução da reação de hipersensibilidade. Em relação às glicoproteínas, existe também a necessidade de se testar a construção contendo o gene precursor de Gn e Gc, reproduzindo o processo de clivagem que ocorre nas infecções naturais de tospovirus.

Experimentos adicionais para a análise da complementação entre os isolados que superam ou não a resistência do gene *Sw-5* podem ser futuramente realizados, visando-se determinar qual dos genes virais estaria envolvido na quebra de resistência mediada por este gene em tomate.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- 1) A alta porcentagem de plantas infectadas com isolados de PepYMV reforça a necessidade de medidas de controle visando, preferencialmente, a resistência a esse patógeno. Em condições de campo, os sintomas causados por PepYMV e os causados por begomovírus muitas vezes se confundem. Ressalta-se também que a identificação de infecções mistas em diversas amostras de campo indica que a possível interação (sinergismo/antagonismo) entre espécies virais pode constituir-se em um fator complicador na diagnose desses patógenos. Assim, a análise de sintomas apresenta limitações para ser utilizada como técnica confiável de diagnose, sendo necessária a utilização de métodos mais precisos de detecção viral para monitoramento dos campos de cultivo de tomateiro.
  
- 2) A importância de *S. habrochaites* como fonte de fatores de resistência a múltiplas espécies de *Potyvirus* foi confirmada. O presente trabalho também corresponde ao primeiro relato da resistência genética a PepYMV em acessos de outras espécies de *Solanum* (secção *Lycopersicon*), tais como *S. corneliomuelleri* e *S. peruvianum*. No ponto de vista do melhoramento genético, a identificação de acessos resistentes derivados de *S. habrochaites* e *S. pimpinellifolium*, permitem cruzamentos sem barreiras interespecíficas e estudos genéticos da herança da resistência.
  
- 3) Foi confirmado que a espécie *S. peruvianum* é a fonte mais importante de resistência contra distintas espécies de *Tospovirus* que apresentam ampla distribuição nas regiões neotropicais da América do Sul. Fontes de resistência alternativas foram identificadas em acessos das espécies *S.*

*chilense*, *S. corneliomuelleri* e *S. lycopersicum*. A presença de diversidade genética para resistência a espécies de tospovírus é de extremo interesse para os programas de melhoramento, especialmente no caso do surgimento de novos isolados, patótipos e/ou espécies com um perfil de virulência mais amplo. Além disso, esta diversidade genética na planta hospedeira poderá permitir que diferentes fatores de resistência possam ser “piramidados” em cultivares de tomate e/ou servir como genes alternativos em casos emergenciais.

- 4) O par de *primers* ‘Sw-5-2’ tem grande potencial de uso em programas de seleção assistida, especialmente pela sua natureza co-dominante e por gerar um amplicon que corresponde a própria sequência gênica, o que assegura uma permanente associação fenótipo-genótipo. Este par de *primers* apresenta ainda uma vasta gama de aplicações constituindo-se em uma ferramenta robusta de seleção para o monitoramento da introgressão do locus *Sw-5* em acessos de tomate. Por conseguir identificar claramente o locus, este marcador pode ser usado para amplificar loci análogos em outras fontes de resistência a tospovírus em *Solanum* (seção *Lycopersicon*). Outro uso possível deste par de *primers* seria a busca por ortólogos do gene *Sw-5* que podem estar presentes em outras espécies do gênero *Solanum*, aumentando sua potencialidade e universalidade, podendo assim, ser usado em outros programas de melhoramento além de tomate.
- 5) O modelo biológico utilizando-se *N. benthamiana* transgênica expressando uma cópia funcional do gene *Sw-5*, mostrou-se eficiente no estudo de genes de avirulência do patógeno e variantes virais capazes de superar genes de resistência. O estabelecimento e validação desse modelo consiste em uma

contribuição importante para o estudo das interações entre genes de tospovírus e genes de resistência de hospedeiros desses patógenos.

- 6)** O gene *Nsm*, os precursores das glicoproteínas (ambos presentes no RNA *M*) e os genes *N* e *Nss* (codificados pelo RNA *S* de TSWV) não foram capazes de induzir o mecanismo de reconhecimento das plantas que expressam o gene *Sw-5* quando presentes de maneira independente. Novas estratégias devem ser adotadas utilizando, por exemplo, combinações das construções que foram produzidas neste trabalho, visando avaliar o efeito aditivo/combinado desses genes na indução da reação de hipersensibilidade. Em relação às glicoproteínas, existe também a necessidade de se testar a construção contendo o precursor, reproduzindo o processo de clivagem que ocorre nas infecções naturais de tospovírus.
- 7)** Novos testes de resistência, tanto para os tospovírus quanto para os potyvírus citados nessa tese, devem ser realizados com os mesmos acessos em condições ambientais distintas, principalmente em relação à amplitude de temperatura e seu efeito na expressão de sintomas da infecção, para a comprovação dos resultados obtidos e estudo da estabilidade da resistência. Além disso, permitiria a ampliação dos resultados testando isolados virais provenientes de regiões geográficas distintas e acessos ainda não avaliados.
- 8)** O marcador específico para o gene *Sw-5* deve ser analisado em um espectro mais amplo de acessos, permitindo estudar a ocorrência de padrões de bandas variáveis associados a genótipos em heterozigose.

- 9) Construções somente com vetores binários devem ser utilizadas na verificação do componente de avirulência da interação *Sw-5* / TSWV, evitando-se assim, a expressão de sintomas de PVX que podem influenciar na observação das reações de hipersensibilidade. Também deve ser observada a interação das construções já obtidas no vetor PVX pgR107 contendo os genes de TSWV em ensaios de complementação, utilizando-se o isolado 'BR-01' e os genes independentes do isolado GRAU. Essa estratégia de estudo via complementação pode fornecer dados biológicos para a elucidação do gene viral envolvido na superação da resistência fornecida pelo gene *Sw-5*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAR, L., BANGRATZ-REYZER, M., HÉRBRAND, E., NDJIONDJOP, M.N., JONES, M. & GHESQUIÈRE, A. Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confers high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*. *Plant Journal* 47:416-426. 2006.
- ALLEX, C.F. Computational methods for fast and accurate DNA fragment assembly. Tese de Doutorado. Madison, WI, EUA. University of Wisconsin – Madison. 1999.
- APEL, K. & HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399. 2004.
- ARAGÃO, F.A.S., RIBEIRO, C.S.C., CASALI, V.W.D. & GIORDANO, L.B. Cultivo de embriões de tomate in vitro visando a introgressão de genes de *Lycopersicon peruvianum* em *L. esculentum*. *Horticultura Brasileira* 20:605-610. 2002.
- ARAMBURU, J. & MARTI, M. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. *Plant Pathology* 52:407. 2003.
- ARAÚJO, M.T., DE ÁVILA, A.C., CUPERTINO, F.P. & MALUF, W.R. *Lycopersicon hirsutum*, nova fonte de resistência ao vírus do vira-cabeça (TSWV). Congresso Brasileiro de Olericultura, Livro de Resumos, Sociedade Brasileira de Olericultura. 1983. p. 164.
- BANDLA, M.D., CAMPBELL, L.R., ULLMAN, D.E. & SHERWOOD, J.L. Interaction of *Tomato spotted wilt virus* *Tospovirus* (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology* 88:98-104. 1998.
- BENDAHMANE, A., KOHN, B.A., DEDI, C. & BAULCOMBE, D.C. The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. *The Plant Journal* 8:933-941. 1995.
- BERGER, P.H., ADAMS, M.J., BARNETT, O.W., BRUNT, A.A., HAMMOND, J., HILL, J.H., JORDAN, R.L., KASHIWAZAKI, S., RYBICKI, E.P., SPENCE, N., STENGER, D.C., OHKI, S.T., UYEDA, I., VAN ZAAYEN, A., VALKONEN, J.P. & VETTEN, H.J. Family Potyviridae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) *Virus taxonomy*. 8<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego. 2005. pp.819-841.
- BEZERRA, I.C., RESENDE, R.O., POZZER, L., NAGATA, T., KORMELINK, R. & DE ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil, with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* 89:823-830. 1999.
- BOITEUX, L.S. Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. *Theoretical and Applied Genetics* 90:146-149. 1995.

- BOITEUX, L.S., CUPERTINO, F.P., SILVA, C., DUSI, A.N., MONTE-NESHICH, D.C., VAN DER VLUGT, R.A.A. & FONSECA, M.E.N. Resistance to potato virus Y (pathotype 1-2) in *Capsicum annuum* and *Capsicum chinensis* is controlled by two independent major genes. *Euphytica* 87:53-58. 1996.
- BOITEUX, L.S. & DE ÁVILA, A.C. Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense* 'PI 159236'. *Euphytica* 75:139-142. 1994.
- BOITEUX, L.S. & GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71:151-154. 1993.
- BOITEUX, L.S., GIORDANO, L.B. & DE ÁVILA, A.C. Sources of multiple genetic resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) in *Lycopersicon* germplasm. *Summa Phytopatologica* 30:108. 2004.
- BOITEUX, L.S., FONSECA, M.E.N. & SIMON P.W. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 124:32-38. 1999.
- BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. B., DE AVILA, A.C. & SANTOS, J.R.M. TSW 10: Uma linhagem de tomate com resistência a três espécies de *Tospovirus*. *Horticultura Brasileira* 11:163-164. 1993.
- BOL, J.F., LINTHORST, H.J.M., CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology* 28:113-138. 1990.
- BOSTOCK, R.M. & STERMER, B.A. Perspectives on wound healing resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 27: 353-371. 1989.
- BRITTLEBANK, C.C. Tomato diseases. *Journal of the Department of Agriculture in Victoria* 17:231-235. 1919.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., FRARY, A. & TANKSLEY, S.D. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1130-1138. 2000.
- BUCHER, E., SIJEN, T., DE HAAN, P., GOLDBACH, R. & PRINS, M. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology* 77:1329-1336. 2003.
- CANADY, M.A., STEVENS, M.R., BARINEAU, M.S. & SCOTT, J.W. Tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. *Euphytica* 117:19-25. 2001.
- CHAGUÉ, V., MERCIER, J.C., GUÉNARD, M., DE COURCEL, A. & VEDEL, F. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 92:1045-1051. 1996.

- CHEN, C.C., CHEN, T.C., LIN, Y.H., YEH, S.D. & HSU, H.T. A chlorotic spot disease on calla lilies (*Zantedeschia* spp.) is caused by a tospovirus serologically but distantly related to *Watermelon silver mottle virus*. *Plant Disease* 89:440-445. 2005.
- CHILD, A. A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) D'Arcy section *Tuberarium* (Dun.) Bitter (s.l.). *Feddes Repertorium* 101:209-235. 1990.
- CHO, J.J., CUSTER, D.M., BROMMONSCHENKEL, S.H. & TANKSLEY, S.D. Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to tomato spotted wilt virus in vegetables. *Acta Horticulturae* 431:367-378. 1996.
- CIUFFO, M., FINETTI-SIALER, M.M., GALLITELLI, D. & TURINA, M. First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw5* resistance gene. *Plant Pathology* 54:564. 2005.
- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Virus. *Journal of General Virology* 34:475-483. 1977.
- CNPQ: Embrapa hortaliças: Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças. [http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/hortalicas\\_em\\_numeros/hortalicas\\_em\\_numeros.htm](http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/hortalicas_em_numeros.htm). Em: 22/09/2008.
- COLLINGE, D.B. & SLUSARENKO, A.J. Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Molecular Biology* 9:389-410. 1987.
- COOLEY, M.B., PATHIRANA, S., WU, H.J., KACHROO, P. & KLESSIG, D.F. Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *The Plant Cell* 12:663-676. 2000.
- COOPER J.I. & JONES A.T. Responses of plants to viruses: Proposals for the use of terms. *Phytopathology* 73: 127-128. 1983.
- CUNHA, L.C.V., RESENDE, R.O., NAGATA, T. & INOUE-NAGATA, A.K. Distinct features of *Pepper yellow mosaic virus* isolates from tomato and sweetpepper. *Fitopatologia Brasileira* 29:663-667. 2004.
- CZECH, A.S., SZKLARCZYK, M., GAJEWSKI, Z., ZUKOWSKA, E., MICHALIK, B., KOBYLOK, T. & STRAZALKA, K. Selection of tomato plants resistant to a local Polish isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV). *Journal of Applied Genetics* 44:473-480. 2003.
- DANGL, J.L. & JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411:826-833. 2001.
- DARWIN, S.C., KNAPP, S. & PERALTA, I.E. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity* 1:29-53. 2003.
- DE ÁVILA, A. C. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. *Horticultura Brasileira* 11:179-183. 1993.

- DE ÁVILA, A.C., DE HAAN, P., KITAJIMA, E.W., KORMELINK, R., RESENDE, R.O., GOLDBACH, R.W. & PETERS, D. Characterization of a distinct isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. *Journal of Phytopathology* 134:133-151. 1992.
- DE ÁVILA, A.C., DE HAAN, P., KORMELINK, R., RESENDE, R.O., GOLDBACH, R. & PETERS, D. Classification of tospovirus based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology* 74:153-159. 1993.
- DE ÁVILA, A.C., INOUE-NAGATA, A.K., COSTA, H., BOITEUX, L.S., NEVES, L.O.Q., 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.
- DE BREUIL, S., ABAD, J.A., NOME, C.F., GIOLOTTI, F.J., LAMBERTINI, P.L. & LENARDON, S. *Groundnut ringspot virus*: an emerging *Tospovirus* inducing disease in peanut crops. *Journal of Phytopathology* 155:251-254. 2007.
- DE HAAN, P., ULTZEN, T., PRINS, M., GIELEN, J., GOLDBACH, R. & VAN GRINSVEN, M. Transgenic tomato hybrids resistant to tomato spotted wilt virus infection. *Proceedings of the international symposium on tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops. Acta Horticulturae* 431:417-426. 1996.
- DE HAAN, P., WAGEMAKER, L., PETERS, D. & GOLDBACH, R. Molecular cloning an terminal sequence determination of the S and M RNAs of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 70:3469-3473. 1989.
- DIANESE, E.C., RESENDE, R.O. & INOUE-NAGATA, A.K. Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. *Tropical Plant Pathology* 33:67-68. 2008.
- DIAZ-PENDON, J.A., TRUNIGER, V., NIETO, C., GARCIA-MAS, J., BENDAHMANE, A. & ARANDA, M. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology* 5:223-233. 2004.
- DIEZ, M.J., ROSELLÓ, S., JORDÁ, C., LACASA, A., COSTA, J. & NUEZ, F. Agronomic behavior of resistant tomato cvs. and lines to TSWV and influence of inoculation methods. *Acta Horticulturae* 402:527-532. 1995.
- DOGANLAR, S., FRARY, A. & TANKSLEY, S.D. Production of interespecific F1 hybrids, BC1, BC2 and BC3 populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of peruvianum carrying new root-knot nematode resistance genes. *Euphytica* 95:203-207. 1997.
- DONG, J.H., CHENG, X.F., YIN, Y.Y., FANG, Q., DING, N. LI, T.T., ZHANG, L.Z., SU, X.X., MCBEATH, J.H. & ZHANG, Z.K. Characterization of tomato zonate spot virus, a new tospovirus in China. *Archives of Virology* 153:855-864. 2008.
- DUPRAT, A., CARANTA, C., REVERS, F., MENAND, B., BROWNING, K.S. & ROBAGLIA, C. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant Journal* 32:927-934. 2002.

- FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) Virus taxonomy. 8<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego. 2005. 1259p.
- FERNANDES, F.R., ALBUQUERQUE, L.C., GIORDANO, L.B., BOITEUX, L.S., DE ÁVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36:251-258. 2008.
- FERREIRA, S.S., FONTES, E.P.B., ZERBINI, F.M. Occurrence of begomoviruses and satellite DNAs in weeds and tomato plants in Southeastern Brazil. In: 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Anais. 2005.
- FINLAY, K.W. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. *Australian Journal of Scientific Research* 5:305-314. 1953.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296. 1971.
- FOLKERTSMA, R.T., SPASSOVA, M.I., PRINS, M., STEVENS, M.R., HILLE, J. & GOLDBACH R. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. Stevens and its application to physically map the *Sw-5* locus. *Molecular Breeding* 5:197-207. 1999.
- FONTES, R.R. Solo e nutrição da planta. In: Silva, J.B.C. & Giordano, L.B. (Eds.) *Tomate para processamento industrial*. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Brasília. 2000. pp. 22-35.
- FONTES, P.C.R. & SILVA, D.J.H. *Produção de tomate de mesa*. Aprenda Fácil. Viçosa. 2002. 196 p.
- FOSBERG, F.R. New nomenclatural combination for Galapagos plant species. *Phytologia* 62:181-183. 1987.
- FRASER, R.S.S. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28:179-200. 1990.
- GARLAND, S., SHARMAN, M., PERSLEY, D. & MCGRATH, D. The development of an improved PCR-based marker system for *Sw-5*, an important TSWV resistance gene of tomato. *Australian Journal of Agricultural Research* 56:285-289. 2005.
- GAO, Z., JOHANSEN, E., EYERS, S., THOMAS, C.L., ELLIS, T.H.N. & MAULE, A.J. The potyvirus recessive resistance gene *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant Journal* 40:376-385. 2004.
- GEBHARDT, C. & VALKONEN, J.P. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology* 39:79-102. 2001.
- GEISENBERG, C. & STEWART, K. Field crop management. In: ATHERTON, J.C. & RUDICH, J. (Eds.) *The tomato crop: a scientific basis for improvement*. Chapman and Hall. Londres. 1986. pp. 511-557.

- GILARDI, P., GARCIA-LUQUE, I. & SERRA, M.T. Pepper mild mottle virus coat protein alone can elicit the *Capsicum* spp. *L* gene-mediated resistance. *Molecular Plant Microbe Interaction* 11:1253-1257. 1998.
- GIORDANO, L.B., DE AVILA, A.C., CHARCHAR, J.M., BOITEUX, L.S. & FERRAZ, E. 'Viradoro': A tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *Horticultural Science* 35:1368-1370. 2000.
- GIORDANO, L.B. & RIBEIRO, C.S. Origem, botânica e composição química do fruto. In: Silva, J.B.C. & Giordano, L.B. (Eds.) *Tomate para processamento industrial*. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Brasília. 2000. pp. 12-17.
- GIORDANO, L.B. & SILVA, J.B.C. Clima e época de plantio. In: In: Silva, J.B.C. & Giordano, L.B. (Eds.) *Tomate para processamento industrial*. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Brasília. 2000. pp. 18-21.
- GOLDBACH, R. & PETERS, D. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology* 5:113-120. 1994.
- GOLDBACH, R. & PETERS, D. Molecular and biological aspects of tospoviruses. In: Elliot, R.M. (Ed.) *The Bunyaviridae*. Plenum Press. New York. 1996. pp. 129-157.
- GORDILLO, L.F., STEVENS, M.R., MILLARD, M.A. & GEARY, B. Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease* 92:694-704. 2008.
- GREENBERG, J.T. & YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6:201-211. 2004.
- GRUBE, R.C., RADWANSKI, E.R. & JAHN, M.M. Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae*. *Genetics* 155:873-887. 2000.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & KANYUKA, K. Resistance genes (*R* genes) in plants. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2007.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & PARKER, J.E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14:177-193. 2003.
- HEATH, M.C. Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9:389-397. 1987.
- HEATH, M.C. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334. 2000.
- HEATH, M.C. The role of gene-for-gene interactions in the determinations of host species specificity. *Phytopathology* 81:127-130. 1991.
- HERRERO, S., CULBREATH, A.K., CSINOS, A.S., PAPPU, H.R., RUFTY, R.C. & DAUB, M.E. Nucleocapsid gene-mediated transgenic resistance provides protection against *Tomato spotted wilt virus* epidemics in the field. *Phytopathology* 90:139-147. 2000.

- HOFFMANN, K., QIU, W.P. & MOYER, J.W. Overcoming host- and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:242-249. 2001.
- HOGENHOUT, S.A., AMMAR, E.D., WHITFIELD, A.E. & REDINGBAUGH, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology* 46:327-359. 2008.
- HOLMES, F.O. Resistance to spotted wilt of tomato. *Phytopathology* 38:467-473. 1948.
- HUANG, C.F. & WILLIAMSON, V.M. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. *The Plant Journal* 34:585-593. 2003.
- HULBERT, S.H., WEBB, C.A., SMITH, S.M. & SUN, Q. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology* 39:285-312. 2001.
- HULL, R. *Matthews' Plant Virology*. 5<sup>th</sup> Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press. 2002.
- INOUE-NAGATA A.K., KORMELINK R., NAGATA T., KITAJIMA E.W., GOLDBACH R. & PETERS D. Effects of temperature and host on the generation of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs. *Phytopathology* 87:1168-1173. 1997.
- INOUE-NAGATA, A.K. & RESENDE, R.O. *Pepper yellow mosaic virus*. In: Rao, G.P., Kumar, P.L. & Holgun-Peña, R.J. *Characterization, Diagnosis & Management of Plant Viruses*. Vol. 3: Vegetable and Pulse Crops. Texas, U.S.A. Studium Press LLC. 2008. pp. 195-202.
- INOUE-NAGATA, A.K., FONSECA, M.E.N., RESENDE, R.O., BOITEUX, L.S., MONTE, D.C., DUSI, A.N., DE ÁVILA, A.C. & VAN DER VLUGT, R.A.A. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. *Archives of Virology* 147:849-855. 2002.
- JOHANSEN, L.K. & CARRINGTON, J.C. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology* 126:930-938.
- JONES, L., HAMILTON, A.J., VOINNET, O., THOMAS, C.L., MAULE, A.J. & BAULCOMBE, D.C. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11:2291-2301. 1999.
- JUHÁSZ, A.C.P., SILVA, D.J.H., ZERBINI JÚNIOR, F.M., SOARES, B.O. & AGUILERA, G.A.H. Screening of *Lycopersicon* sp. Accessions for resistance to *Pepper yellow mosaic virus*. *Scientia Agricola* 63:510-512. 2006.
- KANG, B.C., YEAM, I., FRANTZ, J.D., MURPHY, J.F. & JAHN, M.M. The *pvr1* locus in pepper encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg. *Plant Journal* 41:392-405. 2005.

- KANYUKA, K., DRUKA, A., CALDWELL, D.G., TYMON, A., McCALLUM, N., WAUGH, R. & ADAMS, M.J. Evidence that the recessive bymovirus resistance locus *rym4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Molecular Plant Pathology* 6:449-458. 2005.
- KEPPLER, L.D. & BAKER, C.J. O<sub>2</sub>-initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions. *Phytopathology* 79:555-562. 1989.
- KORMELINK, R., DE HAAN, P., PETERS, D. & GOLDBACH, R. Viral synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants. *Journal of General Virology* 73:687-693. 1992.
- LACORTE, C. Improving and assessing viral vectors for recombinant protein production in plants. Tese de Doutorado, Wageningen, Holanda. 2006.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. 1970.
- LANFERMEIJER, F.C., DIJKHUIS, J., STURRE, M.J.G., DE HAAN, P. & HILLE, J. Cloning and characterization of the durable *Tomato mosaic virus* resistance gene *Tm-22* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology* 52:1039-1051. 2003.
- LANGELLA, R., ERCOLANO, M.R., MONTI, L.M., FRUSCIANTE, L. & BARONE A. Molecular marker assisted transfer of resistance to TSWV in tomato elite lines. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79:806-810. 2004.
- LATHAM, L.J. & JONES, R.A.C. Selection of resistance breaking strains of Tomato Spotted Wilt Tospovirus. *Annals of Applied Biology* 133:385-402. 1998.
- LAU, D., OLIVEIRA, J.C.F., LAU, E.Y. & BROMMONSCHENKEL, S.H. Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene de resistência *Sw-5* de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 31:247-253. 2006.
- LELLIS, A.D., KASSCHAU, K.D., WHITHAM, S.A. & CARRINGTON, J.C. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology* 12:1046-1051. 2002.
- LIMA, G.S.A. Resistência a tospovírus, clonagem e caracterização molecular de alelos do loco *Sw-5* em espécies de *Lycopersicon*. Tese de Doutorado. Viçosa, MG, Brasil. Universidade Federal de Viçosa - MG. 2001.
- LIMA, G.S.A., BROMMONSCHENKEL, S.H. & VENTURA, G.M. Resistência de amplo espectro a tospovírus em acessos de *Lycopersicon peruvianum* e *L. chilense*. *Summa phitopatológica* 29:352-354. 2003.
- LOPES, C.A. & DE ÁVILA, A.C. Doenças do tomateiro. 2ª edição. Brasília Embrapa Hortaliças. 2005.
- LOURENÇÃO, A.L., NAGAI, H., SIQUEIRA, W.J., USBERTI FILHO, J.A. & MELO, A.M.T. Seleção de tomateiros resistentes a tospovírus. *Bragantia* 56:21-31. 1997.

- LOURENÇÃO, A.L., SIQUEIRA, W.J., MELO, A.M.T., PALAZZO, S.R.L., MELO, P.C.T. & COLARICCIO, A. Resistência de cultivares e linhagens de tomateiro a *Tomato chlorotic spot virus* e a *Potato virus Y*. *Fitopatologia Brasileira* 30:609-614. 2005.
- LOVATO, F.A., INOUE-NAGATA, A.K., NAGATA, T., DE ÁVILA, A.C., PEREIRA, L.A.R. & RESENDE, R.O. The N protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in *Capsicum chinense* plants, a hypersensitive host to TSWV infection. *Virus Research* 137:245-252. 2008.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E., COSTA, H., CAPUCHO, A.S., DE ÁVILA, A.C., INOUE-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.
- MALUF, W.R., BRAGHINI, M.T. & CORTE, R.D. Progress in breeding tomatoes for resistance to tomato spotted wilt. *Revista Brasileira de Genética* 14:509-525. 1991.
- MARGARIA, P., CIUFFO, M., PACIFICO, D. & TURINA, M. Evidence that the nonstructural protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the *Tsw* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20:547-558. 2007.
- MARTIN, G.B., BOGDANOVE, A.J. & SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Reviews of Plant Biology* 54:23-61. 2003.
- MAULE, A.J., CARANTE, C. & BOULTON, M.I. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology* 8:223-231. 2007.
- MCMICHAEL, L.A., PERSLEY, D.M. & THOMAS, J.E. A new tospovirus serogroup IV species infecting capsicum and tomato in Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathology* 31:231-23. 2002.
- MEHRABAN, A.H. Virus-host interactions of *Tomato yellow ring virus*, a new *Tospovirus* from Iran. Tese de doutorado. Wageningen, Holanda. Wageningen University. 2008.
- MEHRABAN, A.H., SAAIJER, J., PETERS, D., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. A new tomato-infecting tospovirus from Iran. *Phytopathology* 95:852-858. 2005.
- MELO P.C.T., BOITEUX L.S., VILELA N.J., FERRAZ, E. Tomate para Processamento Industrial. In: ACS Albuquerque; AG Silva. (Eds). *Desenvolvimento da Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas*. 1 ed. Brasília-DF: Embrapa, v. 1, p. 547-556. 2008.
- MORITZ, G., KUMM, S. & MOUND, L. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research* 100:143-149. 2004.
- MOUND, L.A. The *Thysanoptera* vector species of *Tospoviruses*. *Acta Horticulturae* 431:298-307. 1996.

- NAGAI, H. Melhoramento do pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência ao vírus Y. Horticultura Brasileira 1:3-9. 1983.
- NAGAI, H. Obtenção de variedades de pimentão resistentes às moléstias de vírus. Bragantia 27:311-336. 1968.
- NAGAI, H. Pimentão, pimenta-doce e pimentas. In: Furlani, M.M.C. & Végas, G.P. O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico. v.1. Campinas, São Paulo. Instituto Agronômico. 1993. pp.276-294.
- NAGAI, H. Resistance to spotted wilt virus hybrid tomatoes derived from *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. Revista de Olericultura 15:22-23. 1975.
- NAGATA, T., ALMEIDA, A.C.L., RESENDE, R.O. & DE ÁVILA, A.C. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. Plant Pathology 53:136-140. 2004.
- NAGATA, T., BOITEUX, L.S., IIZUKA, N. & DUSI, A.N. Identification of phenotypic variation of tospovirus isolates in Brasil based on serological analysis and differential host response. Fitopatologia Brasileira 18:425-430. 1993.
- NAGATA, T., INOUE-NAGATA, A.K., PRINS, M., GOLDBACH, R. & PETERS, D. Impeded thrips transmission of defective *Tomato spotted wilt virus* isolates. Virology 90:454-459. 2000.
- NAGATA, T., MOUND, F.H., FRANÇA, F.H. & DE ÁVILA, A.C. Identification and rearing of four thrips species vectors of Tospovirus in the Federal District, Brazil. Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia 28:535-539. 1999.
- NICAISE, V., GERMAN-RETANA, S., SANJUÁN, R., DUBRANA, M., MAZIER, M., MAISONNEUVE, B., CANDRESSE, T., CARANTA, C. & LEGALL, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. Plant Physiology 132:1272-1282. 2003.
- NIETO, C., MORALES, M., ORJEDA, G., CLEPET, C., MONTFORT, A., TRUNIGER, V., STURBOIS, B., ARUS, P., CABOCHE, M., PUIGDOMENECH, P., PITRAT, M., DOGIMONT, C., GARCIA-MAS, J., ARANDA, M. & BENDAHMANE, A. An *elf4e* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. Plant Journal 48:452-462. 2006.
- PALAZZO, S.R.L., BERGMANN, J.C., CHAVES, A.R., CHAVES, M., CHARGAS, C.M. & COLARICCIO, A. Surto de potyvírus associado ao mosaico amarelo de tomateiro no Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica 30:117. 2004.
- PARRELLA, G., RUFFEL, S., MORETTI, A., MOREL, C., PALLOIX, A. & CARANTA, A. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in collinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. Theoretical Applied Genetic 105:855-861. 2002.
- PATERSON, R.G., SCOTT, S.J. & GERGERICH, R.C. Resistance of two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. Euphytica 43:173-178. 1989.

- PERALTA, I.E. & SPOONER, D.M. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* 88:1888-1902. 2001.
- PERALTA, I.E., KNAPP, S. & SPOONER, D.M. New species of wild tomatoes (*Solanum* Section: *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany* 30:424-434. 2005.
- PERALTA, I.E., KNAPP, S. & SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Report on Tomato Genetics Cooperative* 56:6-12. 2006.
- PIETERSEN, G. & MORRIS, J. Natural occurrence of groundnut ringspot virus on soybean in South Africa. *Plant Disease* 86:1271. 2002.
- POZZER, L., RESENDE, R.O., LIMA, M.F., KITAJIMA, E.W., GIORDANO, L.B. & DE ÁVILA, A.C. Tospovirus: uma visão atualizada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4:95-148. 1996.
- PRINS, M. & GOLDBACH, R. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in Microbiology* 6:31-35. 1998.
- RESENDE, R.O. Diversidade de tospovírus no mundo. Informações resumidas sobre o "International Symposium of Tospoviruses and Thrips of Floral and Vegetable Crops". *Fitopatologia Brasileira* 20:656-657. 1995.
- RESENDE, R.O., HAAN P., DE AVILA, A.C., KITAJIMA, E.W., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. & PETERS, D. Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *Journal of General Virology* 72:2375-2383. 1991.
- RESENDE, R.O., POZZER, L., NAGATA, T., BEZERRA, I.C., LIMA, M.I., GIORDANO, L.B., KITAJIMA, E.W. & DE ÁVILA, A.C. New tospoviruses found in Brazil. *Acta Horticulturae* 431:78-79. 1996.
- REVERS, F., GALL, O.L., CANDRESSE, T. & MAULE, A.J. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:367-376. 1999.
- RIBEIRO, D., FORESTI, O., DENECKE, J., WELLINK, J., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. *Tomato spotted wilt virus* glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. *Journal of General Virology* 89:1811-1818. 2008.
- RIECHMANN, J.L., LAIN, S. & GARCIA, J.A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73:1-16. 1992.
- ROBAGLIA, C. & CARANTA, C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Plant Cell* 12:1917-1926. 2006.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L. & MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347. 1993.

- ROOSSINCK, M.J. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35:191-209. 1994.
- ROSELLÓ, S., DIEZ, M.J. & NUEZ, F. Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *European Journal of Plant Pathology* 104:499-509. 1998.
- ROSELLÓ, S., DIEZ, M.J. & NUEZ, F. Viral disease causing great economic losses to the tomato crop. *Scientia Horticulturae* 67:117-150. 1996.
- ROSELLÓ, S., DIEZ, M.J., LACASA, A., JORDÁ, C. & NUEZ, F. Testing resistance to TSWV introgressed from *Lycopersicon peruvianum* by artificial transmission techniques. *Euphytica* 98:93-98. 1997.
- ROSELLÓ, S., SOLER, S., DIEZ, M.J., RAMBLA, J.L., RICHARTE, C. & NUEZ, F. New sources for high resistance of tomato to the tomato spotted wilt virus from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Breeding* 118:425-429. 1999.
- ROWHANI, A., UYEMOTO, J.K. & GOLINO, D.A. A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll associated viruses. *Plant Disease* 81:799-801. 1997.
- RUFFEL, S., DUSSAULT, M.H., PALLOIX, A., MOURY, B., BENDAHMANE, A., ROBAGLIA, C. & CARANTA, C. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal* 32:1067-1075. 2002.
- RUFFEL, S., GALLOIS, J.L., LESAGE, M.L. & CARANTA, C. The potyvirus recessive resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Molecular Genetic and Genomics* 274:346-353. 2005.
- RUFFEL, S., GALLOIS, J.L., MOURY, B., ROBAGLIA, C., PALLOIX, A. & CARANTA, C. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. *Journal of General Virology* 87:2089-2098. 2006.
- SAIDI, M. & WARADE, D. Tomato breeding for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV): an overview of conventional and molecular approaches. *Czech Journal of Plant Breeding* 44:83-92. 2008.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SAMUEL, G., BALD, J.G., PITTMAN, H.A. Investigation on spotted wilt of tomatoes. *Australian Council of Science Industry Research Bulletin* 44:64. 1930.
- SATO, M., NAKAHARA, K., YOSHII, M., ISHIKAWA, M. & UEDA, I. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Letters* 579:1167-1171. 2005.
- SCOTT, J.W., STEVENS, M.R. & OLSON, S.M. An alternative source of resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Tomato Genetics Cooperative Report* 55:40-41. 2005.

- SHUKLA, D.D., THOMAS, J.E., MCKERN, N.M., TRACY, S.L. & WARD, C.W. Coat protein of *Potyvirus*s. Comparison of biological properties, serological relationships and coat protein amino acid sequences of four strains of *Potato virus Y*. Archives of Virology 102:207-219. 1988.
- SILBERSCHMIDT, K.M. A doença de vira-cabeça do fumo. O Biológico 3:183-184. 1937.
- SNIPPE, M., BORST, W.L., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. Tomato spotted wilt virus Gc and N proteins interact in vivo. Virology 357:115-123. 2007.
- SMIECH, M., RUSINOWSKI, Z., MALEPSZY, S. & NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. New RAPD markers of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in *Lycopersicon esculentum* Mill. Acta Physiologica Plantarum 22:299-303. 2000.
- SOLER, S., CEBOLLA-CORNEJO, J. & NUEZ, F. Control of diseases induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. Phytopathology Mediterranea 42:207-219. 2003.
- SPASSOVA, M.I., PRINS, T.W., FOLKERTSMA, R.T., KLEIN-LANKHORST, R.M., HILLE, J., GOLDBACH, R.W. & PRINS, M. The tomato gene *SW5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. Molecular Breeding 7:151-161. 2001.
- STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G. & JONES, J.D. Molecular genetics of plant disease resistance. Science 268:661-667. 1995.
- STEIN, N., PEROVIC, D., KUMLEHN, J., PELLIO, B., STRACKLE, S., STRENG, S., ORDON, F. & GRANER, A. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive *Bymovirus* resistance in *Hordeum vulgare*. Plant Journal 42:912-922. 2005.
- STEVENS, M.R., LAMB, E.M. & RHOADS, D.D. Mapping the *Sw-5* locus for *Tomato spotted wilt virus* resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. Theoretical and Applied Genetics 90:451-456. 1995.
- STEVENS, M.R., HEINY, D.K., GRIFFITHS, P.D., SCOTT, J.W. & RHOADS, D.D. Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to the tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance gene *Sw-5*. TGC Report 46:27-28. 1996.
- STEVENS, M.R., SCOTT, S.J. & GERGERICH, R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. Euphytica 59:9-17. 1992.
- STEVENS, M.R., SCOTT, S.J. & GERGERICH, R.C. Evaluation of seven *Lycopersicon* species for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV). Euphytica 80:79-84. 1994.
- STORMS, M.M., KORMELINK R., PETERS D., VAN LENT J.W. & GOLDBACH R.W. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. Virology 214:485-493. 1995.

- TAKEDA, A., SUGIYAMA, K., NAGANO, H., MORI, M., KAIDO, M., MISE, K., TSUDA, S. & OKUNO, T. Identification of a novel RNA silencing suppressor, Nss protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Letters* 532:72-79. 2002.
- THOMPSON, G.J. & VAN ZIJL, J.J.B. Control of tomato spotted wilt virus in tomatoes in South Africa. *Acta Horticulturae* 431:79-84. 1996.
- UHDE, K., FISCHER, R. & COMMANDEUR, U. Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of Potato virus X particles. *Archives of virology* 150:327-340. 2005.
- ULLMAN, D.E., GERMAN, T.L., SHERWOOD, J.L., WESTCOT, D.M. & CANTONE, F.A. *Tospovirus* replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology* 83:456-563. 1993.
- ULLMAN, D.E., WHITFIELD, A.E. & GERMAN, T. Thrips and tospoviruses come of age. Mapping determinants of insect transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102:4931-4932. 2005.
- VAN POELWIJK, F., BOYE, K., OOSTERLING, R., PETERS, D. & GOLDBACH, R. Detection of the L protein of tomato spotted wilt virus. *Virology* 197:468-470. 1993.
- VAN BENTEM, S.F., VOSSEN, J.H., DE VRIES, K.J., VAN WEES, S., TAMELING, W.I.L., DEKKER, H.L., DE KOSTER, C.G., HARINA, M.A., TAKKEN, F.L.W. & CORNELISSEN, B.J.C. Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *The Plant Journal* 43:284-298. 2005.
- VAN DE WETERING, F., GOLDBACH, R. & PETERS, D. Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology* 86:900-905. 1996.
- VAN ZIJL, J.J.B., BOSCH, S.E. & COETZEE, C.P.J. Breeding tomatoes for processing in South Africa. *Acta Horticulturae* 194:69-75. 1986.
- WEBER, H., SCHULTZE, S. & PFITZNER, A.J. Two amino acid substitutions in tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-2(2) resistance gene in the tomato. *Journal of Virology* 67:6432-6438. 1993.
- WHITHAM, S., DINESH-KUMAR, S.P., CHOI, D., HEHL, R., CORR, C. & BAKER, B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1011-1015. 1994.
- WHITFIELD, A.E., ULMAN, D.E. & GERMAN, T.L. Tospovirus-thrips interactions. *Annual Reviews on Phytopathology* 43:459-489. 2005.
- WIJKAMP, I., VAN LENT, J., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. & PETERS, D. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology* 74:341-349. 1993.

- WIJKAMP, I., ALMARZA, N., GOLDBACH, R. & PETERS, D. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85:1069-1074. 1995.
- WILLIAMS, L.V., LÓPEZ-LAMBERTINI, P.M., SHOHARA, K. & BIDERBOST, E.B. Occurrence and geographical distribution of tospovirus species infecting tomato crops in Argentina. *Plant Disease* 85:1227-1229. 2001.
- WINTER, S., SHAHRAEEN, N., KOERBLER, M. & LESEMANN, D.E. Characterization of *Tomato fruit yellow ring virus*: a new *Tospovirus* species infecting tomato in Iran. *Plant Pathology* 55:287. 2006.
- VARSHNEY, R.K., GRANER, A. & SORRELLS, M.E. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends on Plant Science* 10: 621-630. 2005.
- XIE, Z. & CHEN, Z. Hairpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Molecular Plant-Microbe interactions* 13:183-190. 2000.
- YOSHII, M., NISHIKIORI, M., TOMITA, K., YOSHIOKA, N., KOZUKA, R., NAITO, S. & ISHIKAWA, M. The *Arabidopsis Cucumovirus multiplication 1* and *2* loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *Journal of Virology* 78:6102-6111. 2004.
- ZAMBOLIM, E.M. Purificação do vírus do mosaico comum do feijoeiro e sua detecção em semente pelo teste de imuno-adsorção com enzima ligada ao anti-corpo ("ELISA"). Tese de Mestrado. Viçosa, M.G., Brasil. 1984.
- ZERBINI, F.M. & MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família Potyviridae – Parte I. In: Luz, W.C., Fernandes, J.M.C., Prestes, A.M. & Picinini, E.C. (Eds) *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 7:1-66. 1999.
- ZIEGLER, A., COWAN, G.H., TORRANCE, L., ROSS, H.A. & DAVIS, H.V. Facile assessment of cDNA constructs for expression of functional antibodies in plants using the potato virus X vector. *Molecular Breeding* 6:327-335. 2000.

## **ANEXOS**

(Um artigo publicado e um artigo submetido)



## Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal

Érico C. Dianese<sup>1</sup>, Renato O. Resende<sup>1</sup> & Alice K. Inoue-Nagata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, Cx. Postal 218, 70359-970, Brasília, DF, Brasil

Autor para correspondência: Alice K. Inoue-Nagata, e-mail: alicenag@cnpq.embrapa.br

### RESUMO

Várias doenças ameaçam a produção de tomate, especialmente aquelas causadas por vírus dos gêneros *Begomovirus*, *Tospovirus* e *Potyvirus*. Uma análise de amostras foliares de tomateiro para detecção dos vírus de maior importância no Distrito Federal foi realizada utilizando-se as técnicas de PCR e DAS-ELISA. Em um total de 54 amostras avaliadas, o vírus mais prevalente foi o *Pepper yellow mosaic virus*, um potyvírus responsável por sérias perdas em áreas de produção de pimentão no Brasil. Este resultado reforça a crescente importância deste vírus na produção de tomate. Os sintomas causados por PepYMV são muito similares àqueles causados por begomovírus, portanto é recomendada que uma técnica de detecção apropriada seja utilizada em adição à avaliação visual de sintomas.

**Palavras chave:** *Solanum lycopersicum*, hortaliças, diagnóstico.

### ABSTRACT

#### High incidence of *Pepper yellow mosaic virus* in tomatoes in productive areas of Brazil's Federal District

Various diseases threaten tomato production; especially those caused by viruses of the genera *Begomovirus*, *Tospovirus* and *Potyvirus*. A survey on the major viral diseases occurring on tomatoes in the Federal District was carried out using PCR and DAS-ELISA. Out of 54 evaluated samples, the most prevalent virus was *Pepper yellow mosaic virus*, a potyvirus responsible for heavy losses in sweetpepper production in Brazil. This result highlights the increasing importance of this virus on the tomato crop. Since the symptoms caused by PepYMV infection are similar to those caused by begomoviruses, the use of a proper detection technique is recommended in addition to visual evaluation of symptoms.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, vegetables, diagnosis.

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma hortaliça de grande importância no mundo, sendo afetada por diversas doenças causadas por vírus (tospovírus, begomovírus, tobamovírus e potyvírus). Este trabalho teve por objetivo realizar um estudo dos principais vírus que infectam o tomateiro em um dos principais pólos produtores de olerícolas do Distrito Federal, a região de Taquara. Este núcleo rural apresentou em 2006 a maior área dedicada ao cultivo de hortaliças da região com 697,82 hectares, o que corresponde a 24,8% da área plantada com hortaliças do Distrito Federal (Emater, 2006). A produção de tomate foi de 2.674 toneladas, em uma área de aproximadamente 34 hectares.

Em agosto de 2005, dois campos de produção foram visitados com tomateiros de 30-40 dias (campo 1) e de 80-90 dias (campo 2), com vários híbridos e materiais de polinização aberta. As coletas foram realizadas de maneira tendenciosa, buscando-se plantas de tomate com sintomas de mosaico, clorose, bolhosidade ou amarelecimento (Figura 1). Apenas dois produtores foram visitados, devido à contiguidade das áreas de produção e do provável compartilhamento dos principais patógenos presentes nas lavouras. As 54 amostras

foliares coletadas foram analisadas pela técnica de PCR para detecção de begomovírus utilizando os primers pALV1978 e pARc496 (Rojas *et al.*, 1993) e ELISA para o cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (CMV), os potyvírus *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e os tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV). As análises foram realizadas no Laboratório de Virologia e de Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças.

Das 30 amostras coletadas no campo 1, todas apresentaram infecção por isolados de PepYMV, confirmado pela técnica de DAS-ELISA. Nenhuma delas estava infectada com begomovírus. No campo 2 foram coletadas 24 amostras, sendo que 16 foram positivas para infecção por PepYMV e 18 por begomovírus. Onze amostras analisadas do campo 2 apresentaram infecção mista por PepYMV e begomovírus. Foi detectada a presença de PVY em quatro amostras, de CMV em duas amostras e de TSWV em uma amostra. Os vírus TCSV, GRSV e CSNV não foram detectados.

A alta incidência de PepYMV demonstra o aumento da incidência deste vírus em tomateiro. Os



FIG. 1 - Tomateiro infectado com *Pepper yellow mosaic virus* apresentando sintoma de mosaico.

materiais comerciais de tomate utilizados atualmente são, aparentemente, todos suscetíveis a PepYMV. O potencial de danos para a produção de tomate causada por isolados de PepYMV, conforme relatado em regiões produtoras do Espírito Santo, é alto (de Ávila *et al.*, 2004; Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). Acredita-se que os isolados de PepYMV estejam ocupando o nicho que antigamente era ocupado pelos isolados de PVY, vírus que era responsável por perdas importantes em culturas de tomateiro. A partir da introdução de variedades resistentes (Lourenção *et al.*, 2005), o PVY teve sua importância diminuída, dando lugar ao novo potyvírus identificado em 2002 infectando pimentões e pimentas (Inoue-Nagata *et al.*, 2002). Os testes realizados em amostras coletadas nesta região durante os últimos anos demonstram uma alta incidência dos begomovírus em tomateiro (Fernandes *et al.*, no prelo). Acredita-se que a inexistência de amostras infectadas com begomovírus no campo 1 foi devido ao estágio ainda precoce da cultura e à ausência da mosca-branca nesta lavoura. Já no campo 2, com plantas mais velhas, a incidência de begomovírus foi elevada. O número de amostras coletadas foi pequeno, mas a alta

porcentagem de plantas infectadas com isolados de PepYMV, um vírus com grande potencial de dano à cultura do tomate, reforça a necessidade de medidas de controle visando, preferencialmente, à resistência a esse patógeno. Os sintomas causados por PepYMV e os causados por begomovírus muitas vezes se confundem. Ressalta-se também que a identificação de infecções mistas em diversas amostras de campo indica que a interação (sinergismo/antagonismo) entre espécies virais pode constituir-se em um fator complicador na diagnose desses patógenos. Assim, a análise de sintomas não pode ser utilizada para diagnose de modo confiável, sendo necessária a utilização de métodos mais precisos de detecção viral para monitoramento dos campos de cultivo de tomateiro.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- de Ávila AC, Inoue-Nagata AK, Costa H, Boiteux LS, Neves LOQ, Prates RS, Bertini LA (2004) Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira* 22:655-658.
- Fernandes FR, Albuquerque LC, Giordano LB, Boiteux LS, de Ávila AC, Inoue-Nagata AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36:251-258.
- Inoue-Nagata AK, Fonseca MEN, Resende RO, Boiteux LS, Monte DC, Dusi AN, de Ávila AC, van der Vlugt RAA (2002) *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annum*. *Archives of Virology* 147:849-855.
- Lourenção AL, Siqueira WJ, Melo AMT, Palazzo SRL, Melo PCT, Colariccio A (2005) Resistência de cultivares e linhagens de tomateiro a *Tomato chlorotic spot virus* e a *Potato virus Y*. *Fitopatologia Brasileira* 30:609-614.
- Maciel-Zambolim E, Costa H, Capucho AS, de Ávila AC, Inoue-Nagata AK, Kitajima EW (2003) Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira* 29:325-327.
- Rojas MR, Gilbertson RL, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347.

---

Recebido 27 Agosto 2007 - Aceito 12 Fevereiro 2008 - TPP 7095  
Editor Associado: F. Murilo Zerbini

Editorial Manager(tm) for Molecular Breeding  
Manuscript Draft

Manuscript Number: M0LB1227

Title: Development of a co-dominant Sw-5 (Tospovirus resistance) marker for assisted-selection and allele-specific landing in a wide range of tomato accessions.

Article Type: Manuscript

Keywords: Sw-5; Tospovirus; resistance; marker; PCR; selection

Corresponding Author: Dr. Renato O Resende,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Érico C Dianese, PhD

Order of Authors: Érico C Dianese, PhD; Maria Esther N Fonseca, PhD; Rob Goldbach, PhD; Richard Kormelink, PhD; Alice K Inoue-Nagata, PhD; Renato O Resende; Leonardo S Boiteux, PhD

**Abstract:** The best levels of broad-spectrum Tospovirus resistance in tomatoes are conferred by the Sw-5 locus. This locus contains at least five paralogues (denoted Sw-5a through Sw-5e), of which Sw-5b represents the actual resistance gene. Here we evaluated a panel of seven PCR primer pairs matching different sequences within a region spanning the Sw-5a and Sw-5b gene cluster. Primer efficiency evaluation was done employing tomato lines with and without the Sw-5 locus. One primer pair produced a single and co-dominant polymorphism between susceptible and resistant isolines. Sequence analysis of these amplicons indicated that these were specific for the locus and differences were due to insertions/deletions. This primer pair was also evaluated in field assays and a collection of accessions known to be either susceptible or resistant to tospoviruses. An almost complete correlation was found between resistance under greenhouse/field conditions and the presence of the marker. Therefore, this primer pair is a very useful tool in marker-assisted selection systems in a large range of tomato accessions.

**Suggested Reviewers:** Jari P.T. Valkonen  
Department of Applied Biology, University of Helsinki  
jari.valkonen@helsinki.fi

Developed a line of work related with resistance to virus. Which is intimately related with this work.

**Marcel Prins**  
Gene Exploitation Group, Keygene N.V.  
marcel.prins@keygene.com  
Have some related work with the Sw-5 gene and worked with transient expression of it on plants of tobacco.

**Enrique A Moriones**  
Estacion Experimental La Mayora  
moriones@eelm.csic.es  
Works with plant/pathogen interactions and search for sources of resistance to viruses.

# Development of a co-dominant *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) marker for assisted-selection and allele-specific landing in a wide range of tomato accessions.

Érico C. Dianese<sup>1,2</sup>, Maria Esther de N. Fonseca<sup>1</sup>, Rob Goldbach<sup>3</sup>, Richard Kormelink<sup>3</sup>, Alice K. Inoue-Nagata<sup>1,2</sup>, Renato de O. Resende<sup>2\*</sup> and Leonardo S. Boiteux<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>National Center for Vegetable Crops Research (CNPq), Embrapa Vegetable Crops, CP 218, 70359-970, Brasília-DF, Brazil; <sup>2</sup>Phytopathology Department, University of Brasilia (UnB), 70910-900, Brasília-DF, Brazil; <sup>3</sup>Laboratory of Virology, Wageningen University, Binnenhaven 11, 6709 PD, Wageningen, The Netherlands.

\*Corresponding author: [resende@unb.br](mailto:resende@unb.br) Phone: 55-61-33072424

**Abstract** – The best levels of broad-spectrum *Tospovirus* resistance in tomatoes are conferred by the *Sw-5* locus. This locus contains at least five paralogues (denoted *Sw-5a* through *Sw-5e*), of which *Sw-5b* represents the actual resistance gene. Here we evaluated a panel of seven PCR primer pairs matching different sequences within a region spanning the *Sw-5a* and *Sw-5b* gene cluster. Primer efficiency evaluation was done employing tomato lines with and without the *Sw-5* locus. One primer pair produced a single and co-dominant polymorphism between susceptible and resistant isolines. Sequence analysis of these amplicons indicated that these were specific for the locus and differences were due to insertions/deletions. This primer pair was also evaluated in field assays and a collection of accessions known to be either susceptible or resistant to tospoviruses. An almost complete correlation was found between resistance under greenhouse/field conditions and the presence of the marker. Therefore, this primer pair is a very useful tool in marker-assisted selection systems in a large range of tomato accessions.

**Keywords:** *Sw-5*, *Tospovirus*, resistance, marker, PCR, selection

## Introduction

A number of related *Tospovirus* species (family Bunyaviridae) are responsible for the disease known as “spotted wilt”, “peste negra” (Williams *et al.* 2001), and “vira-cabeça” (Silberschmidt 1937), that causes severe annual yield losses of fresh-market and processing tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) around the world (Gordillo *et al.* 2008). These viruses are transmitted by thrips (Thysanoptera: Thripidae) in a circulative-propagative manner (Wijkamp *et al.* 1995). Susceptible plants show a wide range of symptoms, including chlorotic ringspots on leaves, petiole necrosis, chlorotic and necrotic rings on fruits, apical necrosis and browning, generalized necrosis, and wilting. Early infection of highly susceptible cultivars often leads to complete decay and death (Lopes and de Ávila 2005). *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) and *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) are the four prevalent

*Tospovirus* species infecting tomatoes in tropical and sub-tropical areas of South America (Giordano *et al.* 2000; Williams *et al.* 2001).

Sources of genetic resistance to tospoviruses have been found in domesticated and wild *Solanum* (Section *Lycopersicon*) accessions (for review see Soler *et al.* 2003). The wild tomato species are the best sources of resistance with many accessions being considered as either tolerant or immune to distinct tospovirus isolates and species (Paterson *et al.* 1989; Stevens *et al.* 1994; Roselló *et al.* 1999; Gordillo *et al.* 2008). So far, the best levels of broad-spectrum resistance to tospoviruses are conferred by the *Sw-5* gene from *S. peruvianum*, which was introgressed into the tomato cultivar 'Stevens' (Stevens *et al.* 1992). Plants carrying the *Sw-5* gene are able to restrict the systemic spread of the virus, showing only localized symptoms represented as local lesions caused by a hypersensitive reaction (Stevens *et al.* 1992). The *Sw-5* gene is located on the telomeric region of the long arm of chromosome 9 and it was isolated via positional cloning (Brommonschenkel *et al.* 2000; Spassova *et al.* 2001). In addition, it was found that the tospovirus resistance factor resides within a complex cluster comprising five linked gene copies, named *Sw-5a* through *Sw-5e* (Spassova *et al.* 2001). The efficiency of each copy in conferring resistance to tospovirus species is not yet completely clear, but separate analysis of the copies in transgenic plants indicated that the *Sw-5b* is the single gene for the expression of the resistance phenotype (Spassova *et al.* 2001). The *Sw-5* belongs to the same class of resistance genes as the *Mi*, which confers resistance to *Meloidogyne* species; *RPM1* (resistance gene to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*) and many others R-genes (Brommonschenkel *et al.* 2000; Hammond-Kosack and Kanyuka 2007). This class of resistance genes is named CC-(NB-ARC)-LRR, containing leucine-rich repeats and a highly conserved nucleotide binding site (Hammond-Kosack and Kanyuka 2007).

Due to the economic losses caused by tospoviruses in many areas of the world, genetic resistance became the major research focus related to the disease management (Gordillo *et al.* 2008). The dominant nature of the *Sw-5* allowed a broad use of this locus in the development of hybrid cultivars. It was found that cultivars carrying the *Sw-5* locus had broad-spectrum resistance with high stability to distinct TSWV isolates (Stevens *et al.* 1992; Roselló *et al.* 1998) and also to the related tospovirus species GRSV and TCSV (Boiteux and Giordano 1993; Boiteux *et al.* 1993). Therefore, the incorporation of this locus in commercial cultivars led to a considerable reduction on economic losses caused by tospoviruses, even though this resistance can apparently be broken by some isolates and species (Cho *et al.* 1996; Lathan and Jones 1998; McMichael *et al.* 2002; Aramburu *et al.* 2003; Ciuffo *et al.* 2005), under high inoculum pressure, or drastic temperature variation (Diez *et al.* 1995; Roselló *et al.* 1997; Roselló *et al.* 1998).

The complex nature of the *Tospovirus* species might lead to the occurrence of escapes (false resistant plants) in screening systems of breeding programs. These viruses are quite unstable in sap; symptom expression is highly influenced by environmental conditions and the use of fresh isolates is required in order to avoid the accumulation of defective (more attenuated) variants of the virus (Resende *et al.* 1992; Nagata *et al.* 2000; Moritz *et al.* 2004). Therefore, large-scale selection systems for *Tospovirus* resistance in tomatoes based on *Sw-5* would greatly benefit by the use of molecular markers.

Until now, the marker-assisted systems available for monitoring the incorporation of the *Sw-5* locus into susceptible lines are RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), RAPD-

derived, and cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers (Stevens *et al.* 1995; Stevens *et al.* 1996; Chagué *et al.* 1996; Cho *et al.* 1997; Smiech *et al.*, 2000; Czech *et al.* 2003; Langella *et al.* 2004). These are closely linked markers, which might occasionally be separated from the gene of interest through genetic recombination (crossing-over) events. In this scenario, markers derived from the resistant locus itself, capable of differentiating among susceptible and resistant plants, would be the ideal ones (Folkertsma *et al.* 1999; Garland *et al.* 2005). Although sequences of the *Sw-5* locus are available at public databases, there are few reports of molecular markers derived from them. The work reported by Garland *et al.* (2005) is one of the few exceptions, where a dominant marker derived from the *Sw-5* locus combined with a closed linked CAPS marker were employed to fingerprint tospovirus susceptible and resistant lines.

Here we evaluated a panel of PCR primers spanning part of the *Sw-5* locus aiming to establish a fingerprinting system for this genomic region. The objectives of this research were the following: (a) to develop a specific marker system for the *Sw-5* gene cluster that could be easily used in simple PCR assays; and (b) to validate this system through the evaluation of near-isogenic lines and by screening of a range of accessions contrasting for *Tospovirus* reaction in order to establish their usefulness to monitor the incorporation of the *Sw-5* gene in elite tomato cultivars. In addition, we also characterized (via sequence analysis) the genomic region comprising the most promising polymorphic amplicon in a set of tospovirus resistant and susceptible *Solanum* (Section *Lycopersicon*) accessions of distinct genetic backgrounds in order to evaluate how broad could be the application of this genetic information in marker-assisted tomato breeding programs.

## Material and methods

### Design of the primers and their location within the *Sw-5* locus

Seven sets of primer pairs able to amplify fragments of approximately 400 to 575 bp within the *Sw-5* locus were designed (Table 1) based upon the sequence of the *Sw-5a* and *Sw-5b* genes (accession AY007366). Primer pairs were designed using the Lasergene Package (Lasergene, Madison, WI). According to Spassova *et al.* (2001) the *Sw-5* gene has five copies along the chromosome 9, named *Sw-5a* through *Sw-5e*. The part of the sequence selected for amplification encompassed an area with high identity between the *Sw-5a* and *Sw-5b* copies, covering a region of approximately 3 kb. This region corresponds to the sequence of a TSWV-resistant tomato plant (accession AY007366), which supposedly expresses a template directly related to *Tospovirus* resistance.

### DNA extraction, PCR cycles, and agarose-gel analysis

Genomic DNA of tomato plants was purified as described (Boiteux *et al.* 1999) using a modified 2x CTAB buffer and additional purification steps with organic solvents. PCR reactions were as follows: ca. 1 µg of the DNA, 1 µL of 10X PCR buffer (Invitrogen), 0.3 µL of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.7 µL of 2.5 mM dNTP, 100 ng of each primer, 0.5 Units of Taq DNA polymerase (Invitrogen) and water in a final volume of 10 µL. The Mastercycler (Eppendorf) thermocycler program steps were: denaturation

at 94°C for 2 minutes, followed by 29 cycles of 94°C for 30 seconds, 50°C for 1 minute and 72°C for 30 seconds and final extension at 72°C for 5 minutes. PCR products were resolved using 1% agarose gel in TBE buffer.

### **Greenhouse assays with near-isogenic lines to evaluate the association between primer product profile and tospovirus resistance**

Plants of *S. lycopersicum* cultivars ‘Viradoro’ (resistant to TSWV due to the presence of the *Sw-5* locus) (Giordano *et al.* 2000) and ‘IPA-5’ (near-isogenic line of ‘Viradoro’, susceptible to TSWV) were firstly used as DNA sources for evaluation of the primer pair panel. The accessions were sown in Styrofoam trays with 128 cells, filled with sterile substrate Plantmax® and maintained in a greenhouse. Mechanical inoculation with TSWV (BR01 isolate) was done in 20 plants of each line following standard procedures (Boiteux and Giordano, 1993). Similar mechanical greenhouse inoculation assays were also done with 20 ‘Stevens’ (resistant to TSWV and source of the *Sw-5* gene) plants and 20 ‘Moneymaker’ (susceptible to TSWV) plants. Genomic DNA samples were extracted from individual ‘Stevens’ and ‘Moneymaker’ plants and were amplified to verify the efficiency of the selected set of *Sw-5*-derived primers in revealing polymorphisms.

### **Field assays with near-isogenic lines to evaluate the association between ‘Sw-5-2’ primer amplicon and tospovirus resistance**

Field assays were also conducted for additional confirmation of the most promising primer pair for marker-assisted selection (‘Sw-5-2’). The susceptible Brazilian cultivar ‘Santa Clara’ (Nagai 1993) and backcross-derived families (i.e. BC5 near-isogenic tospovirus resistant lines) using ‘Santa Clara’ as recurrent parent and one inbred line produced at CNPH (Boiteux *et al.* 1993) as donor of the *Sw-5* locus, were simultaneously analyzed via molecular markers and field tests with high inoculation pressure of GRSV. The experiment was conducted at the CNPH experimental station during the dry season (May-August, 2008) in Brasília-DF, Brazil. Field plots were composed by ‘Santa Clara’ (three replications of eight plants each) and 24 backcross families (eight plants per each family).

### **Entire sequence analysis of the cloned amplicons obtained with the ‘Sw-5-2’ primer pair in two near-isogenic lines**

PCR products obtained from the near-isogenic lines ‘Viradoro’ (carrying the *Sw-5* locus) and ‘IPA-5’ (susceptible to tospovirus) were size fractionated on 1.0 % agarose gel. The single individual bands obtained from each line were excised from the gel under UV light and purified using QIAquick Gel extraction kits (QIAGEN Inc., Valencia-CA). Purified bands were cloned into the pGEM-T Easy® vector (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced using SP6 and T7 primers. The sequence obtained for these near-isogenic lines were aligned in the region defined by the ‘Sw-5-2’ primer pair using the Clustal method available in the Megalign program (Lasergene, Madison, WI, USA).

### **Direct sequencing of the ‘Sw-5-2’ PCR amplicons from 14 tomato accessions**

PCR amplicons were also obtained using the ‘Sw-5-2’ primer pair with

genomic DNA extracted from ‘Viradoro’ and ‘IPA-5’ and other 12 accessions of distinct genetic backgrounds (Figure 1). All 14 accessions produced single amplicons with varying sizes when analyzed by agarose-gel electrophoresis. In this assay, all the amplicons of the 14 accessions were directly sequenced from the PCR products using the ‘Sw-5-2’ forward and reverse primers. The sequencing reaction was done using the protocol of the BigDye® terminator cycle sequencing version 3.1 (Applied Biosystems of Brazil, São Paulo) with 2 µL of the amplicons as template. DNA was analyzed in an automatic ABI Prism sequencer model 3100 (Applied Biosystems of Brazil, São Paulo) at the CNPH’s Genomic Analysis Laboratory. The quality of the sequences obtained in the trace files was screened using the SeqMan program (Allex, 1999). The sequences obtained for the 14 accessions were aligned using the Clustal method available in the Megalign program (Lasergene, Madison, WI, USA).

## Results and Discussion

For monitoring of the genomic region encoding a given phenotype expression the so-called gene-derived or functional markers (Varshney *et al.* 2005) represent robust tools as there is no risk for accidental separation through genetic recombination (crossing-over) events as reported for closely linked DNA markers. To date, the identification of functional, specific, and co-dominant PCR markers derived exclusively from the *Sw-5* locus are not publicly available, even though the entire locus has been already cloned and characterized (Brommonschenkel *et al.* 2000; Spassova *et al.* 2001).

In the present work, we evaluated a panel of seven PCR primer pairs (Table 1) derived from sequence information of the *Sw-5* locus aiming to establish a useful fingerprinting system for this genomic region. The primer pairs ‘Sw-5-4’ and ‘Sw-5-7’ displayed a complex amplicon profile with the first being monomorphic and the latter exhibiting a profile of intensity polymorphism, which was very difficult to score. The complex amplicon profiles (with several monomorphic bands) might indicate that these primers were not *Sw-5* locus-specific, the obtained amplicons possibly corresponding to related genes of the CC-(NB-ARC)-LRR class. This assumption was not corroborated by further experimental analyses. The other primer pairs displayed either no reaction at all under the employed PCR conditions (‘Sw-5-1’, ‘Sw-5-3’ and ‘Sw-5-6’) or gave a monomorphic pattern (‘Sw-5-5’). Also for these primers no further testing was carried out.

The PCR primer pair ‘Sw-5-2’ was the only one able to reveal a stable polymorphic pattern between the two near-isogenic lines ‘Viradoro’ and ‘IPA-5’ (Fig. 1, lanes 2 and 9). The PCR profile obtained with this primer pair was a single amplicon, which also provided a stable and reliable discrimination of the cultivars ‘Stevens’ and ‘Moneymaker’ (Fig. 1, lanes 1 and 11). ‘Stevens’ (breeding source of *Sw-5*) had a resistant reaction to TSWV (isolate ‘BR 01’) after mechanical inoculation under greenhouse conditions. All plants of ‘Moneymaker’ were found to be susceptible to this virus in the greenhouse assay. In addition, the amplicon obtained with the primer ‘Sw-5-2’ was found to be co-dominant, indicating the existence of insertions and/or deletions (indels) of about 100 basepairs (bp) in this region.

Parallel evaluation was conducted with both PCR assays with the primer ‘Sw-5-2’ and reaction to GRSV using the cultivar ‘Santa Clara’ (‘Santa Clara S’) as susceptible control and its *Sw-5*-carrying backcross near-isogenic families (‘Santa Clara R’ lines) at field conditions. All 24 plants in all three ‘Santa Clara S’ plots

displayed severe GRSV symptoms (Figure 2) with the virus infection being confirmed by ELISA using a specific antiserum (data not shown). These results indicated an adequate and uniform inoculum pressure across the experimental field. The *Sw-5*-derived marker (an amplicon of ca. 574 bp) was observed in all 192 plants of the 24 near-isogenic ‘Santa Clara R’ families (Figure 1, lane 4). On the other hand, all susceptible ‘Santa Clara S’ plants displayed only a smaller amplicon of around 464 bp (Figure 1, lane 7). An almost complete correlation was observed between the *Sw-5*-derived marker result and resistance to GRSV under field conditions, except for two ‘Santa Clara R’ plants that displayed either apical necrosis or ring spots on the fruits. The presence of a small fraction of susceptible plants is commonly observed even in highly inbred lines carrying the *Sw-5* locus under field conditions in Brazil (e.g. Boiteux and Giordano, 1993). This result has been explained by the incomplete penetrance of the *Sw-5* gene (Stevens *et al.*, 1992) rather than by the occurrence of distinct viral strains and/or environmental effects on gene expression.

PCR assays were also conducted with primer pair ‘Sw-5-2’ using genomic DNA extracted from a collection of 14 accessions known to be either susceptible or resistant to tospovirus isolates (Figure 1). The analyses indicated three DNA patterns. The first group, displaying an amplicon of ca. 575 bp was exhibited by three tospovirus resistant accessions carrying the *Sw-5* locus (‘Stevens’, ‘Viradoro’ and ‘Santa Clara R’) and one *S. peruvianum* ‘PI 128660’, which was found to be resistant to TSWV isolates in Australia and USA (Gordillo *et al.* 2008). The second group displayed an amplicon of ca. 510 bp and encompassed two susceptible accessions (an inbred line derived from the hybrid ‘Nemonetta’ and the cultivar ‘Ohio 8245’). The third group displayed an amplicon of 464 bp and was composed by the two near-isogenic lines ‘IPA-5’ and ‘Santa Clara S’ and six other tospovirus-susceptible accessions and inbred lines derived from commercial hybrids (Figure 1). It is important to mention that, in all situations, heterozygous plants were able to produce amplicons with quite similar intensity allowing, therefore, a reliable co-dominant marker system, especially in gels with higher (1.4-1.8%) agarose concentration (data not shown). However, the presence of more than one gel pattern for the susceptible accessions demands either the comparison with PCR samples from DNA template extracted from sources of the *Sw-5* locus or a careful estimation of the amplicon size. This procedure will avoid misclassification of “pseudo-resistant” plants, for example, in tospovirus susceptible populations segregating for the gel patterns 2 and 3. In addition, it might be possible that novel susceptible gel patterns might occur in tomato accessions with genetic background distinct from the accessions employed here.

The complete sequence analysis of the cloned ‘Sw-5-2’ amplicons obtained from ‘Viradoro’ (574 bp) and ‘IPA-5’ (464 bp) indicated an overall identity of 81.7 % with the presence of indels and point mutations, but with no indication of sequence rearrangements (Figure 3). The estimated 110 bp difference observed in the agarose-gel assays between the near isogenic lines ‘Viradoro’/‘IPA-5’ and ‘Santa Clara R’/‘Santa Clara S’ were caused by two large deletions (83 bp in total) plus eight single nucleotides or small deletions (31 bp in total), which were compensated in size by two insertions in the susceptible lines. Twenty-seven point mutations (21 transitions and six transversions) were observed along the analyzed *Sw-5* derived amplicons (Figure 3).

Amplicons of ‘Viradoro’ and ‘IPA-5’ were also directly sequenced using the ‘Sw-5-2’ forward and reverse primers together with the amplicons obtained with 12 other tomato accessions (Figure 1). For this reason, the sequence analysis was done with only 522 out of the 574 bp PCR amplicons (about 91% of the entire sequence,

which did not include the 'Sw-5-2' primer pair). The results indicated that the amplicons are specific for the *Sw-5* locus and the differences in their sizes are due to a number of insertions/deletions in this genomic region. A number of point mutations were also observed (Figure 4). The sequences of the resistant lines 'Viradoro' and 'Santa Clara R' were 100% identical to that of 'Stevens' for this genomic region. It is interesting to note that the genomic region within the *Sw-5* locus corresponding to the 'Sw-5-2' amplicon was highly conserved across the two *S. peruvianum* loci analyzed here (i.e. the 'Stevens'-derived locus and the 'PI 128660'-derived locus). The sequences of 'Stevens' and 'PI 128660' are almost identical with only a single point transition mutation (T/C) in the position 141 (Figure 4). This level of nucleotide conservation is somewhat surprising for a self-incompatible and allogamous species such as *S. peruvianum*. Only one group of tospovirus-susceptible accessions formed by 'Santa Clara S', 'IPA-5', 'CNPX Tx-557' and inbred lines from 'Densus' and 'Alambra', shared 100% sequence identity. The other susceptible accessions had identity levels ranging from 87.9 to 99.8%. Obviously, it is not yet possible to speculate that this collection of indels and point mutations are directly linked to susceptible reaction of accessions belonging to the PCR pattern groups two and three. For that, it would be necessary to generate mutations in the regions of the *Sw-5* locus corresponding to that observed in the susceptible accessions in order to demonstrate their loss-of-function effects.

From the marker-assisted selection point of view, a reliable, fast, and simple PCR assay to screen for the presence of the *Sw-5* locus is highly desirable. RFLP, RAPD, RAPD-derived and CAPS markers linked to the *Sw-5* locus have been employed for marker-assisted selection in tomato breeding (Stevens *et al.* 1995; Stevens *et al.* 1996; Chagué *et al.* 1996; Cho *et al.* 1997; Smiech *et al.* 2000; Czech *et al.* 2003; Langella *et al.* 2004). This collection of markers might occasionally be separated from the *Sw-5* locus by crossing-over events during the breeding process of generating populations and/or incorporating this gene cluster into elite tomato lines. In this regard, the 'Sw-5-2' co-dominant marker system is more advantageous than all closely linked markers reported thus far.

The marker system reported here is also much simpler than the *Sw-5* locus-derived marker reported by Garland *et al.* (2005). In this example, the ability to discriminate heterozygous from homozygous resistant plants depends on performing a restriction digestion of the PCR products. In addition, it is required the use of the closely linked CT220 marker as a positive control in order to discriminate susceptible plants from false negative PCR reactions (Garland *et al.* 2005).

Altogether, the results obtained with the primer pair 'Sw-5-2' indicate an array of applications as a robust selection tool to monitor the *Sw-5* locus introgression in tomato accessions. Since this marker is able to specifically target the locus, it might be useful to amplify analogous loci in other tospovirus resistance sources in *Solanum* (section *Lycopersicon*) aiming to isolate alleles with potentially distinct characteristics, including thermal stability, better expression of the resistance in fruits, and resistance to isolates able to overcome the *Sw-5*. Another possible use of this primer set would be chromosome landing on *Sw-5* gene orthologues that might be present in other species of the genus *Solanum*, enhancing its scope as a universal marker that would be useful not only for tomato breeding programs.

## **Acknowledgements**

This work was supported by Embrapa Horticultural Crops (CNPq), University of Brasília and Wageningen University and was financed by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). We would like to thank the technical staff, especially Antonio Francisco Costa, Oneilson Medeiros de Aquino, Lúcio Flávio Barbosa, William Pereira Dutra and Dick Lohuis.

## References

- Alex CF (1999) Computational methods for fast and accurate DNA fragment assembly. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin – Madison, Madison, WI, USA. 211pp
- Aramburu J, Marti M (2003) The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. *Plant Pathol* 52:407
- Boiteux LS, Giordano LB (1993) Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71: 151-154
- Boiteux LS, Giordano LB, de Ávila AC, Santos JRM (1993) ‘TSW 10’: uma linhagem de tomate com resistência a três espécies de *Tospovirus*. *Hort Bras* 11:163-164
- Boiteux LS, Fonseca MEN, Simon PW (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *J Amer Soc Hort Sci* 124: 32-38
- Brommonschenkel SH, Frary A, Tanksley SD (2000) The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1130-1138
- Chagué V, Mercier JC, Guénard M, de Courcel A, Vedel F (1996) Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theor Appl Gen* 92:1045-1051
- Cho JJ, Custer DM, Brommonschenkel SH, Tanksley SD (1996) Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to *Tomato spotted wilt virus* in vegetables. *Acta Hort* 431:367-378
- Ciuffo M, Finetti-Sialer MM, Gallitelli, D, Turina M (2005) First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw5* resistance gene. *Plant Pathol* 54:564
- Czech AS, Szklarczyk M, Gajewski Z, Zukowska E, Michalik B, Kobylak T, Strazalka K (2003) Selection of tomato plants resistant to a local Polish isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV). *J Appl Genet* 44: 473-480
- de Ávila AC, de Haan P, Kormelink R., Resende RO, Golbach RW, Peters D (1993) Classification of tospovirus based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J Gen Virol* 74: 153-159
- Diez MJ, Roselló S, Jordá C, Lacasa A, Costa J, Nuez F (1995) Agronomic behavior of resistant tomato cvs. and lines to TSWV and influence of inoculation methods. *Acta Hort* 402:527-532
- Folkertsma RT, Spassova MI, Prins M, Stevens MR, Hille J, Goldbach RW (1999) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. Stevens and its application to physically map the *Sw-5* locus. *Mol Breed* 5:197-207
- Garland S, Sharman M, Persley D, Mcgrath D (2005) The development of an improved PCR-based marker system for *Sw-5*, an important TSWV resistance gene of tomato. *Aust J Agric Res* 56:285-289
- Giordano LB, de Avila AC, Charchar JM, Boiteux LS, Ferraz E (2000) ‘Viradoro’: A tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *HortScience* 35: 1368-1370
- Gordillo LF, Stevens MR, Millard MA, Geary B (2008) Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Dis* 92: 694-704
- Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2007) Resistance genes (*R* genes) in plants. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [DOI: 10.1002/9780470015902.a0020119]

- Langella R, Ercolano MR, Monti LM, Frusciante L, Barone A (2004) Molecular marker assisted transfer of resistance to TSWV in tomato elite lines. *J Hort Sci Biotech* 79:806-810
- Lathan LJ, Jones RAC (1998) Selection of resistance breaking strains of *Tomato spotted wilt tospovirus*. *Ann Appl Biol* 133:385-402
- Lopes CA, de Ávila AC (2005) Doenças do tomateiro. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brazil
- McMichael LA, Persley DM, JE Thomas (2002) A new tospovirus serogroup IV species infecting capsicum and tomato in Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathol* 31(3): 231-23
- Moritz G, Kumm S, Mound L (2004) Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Res* 100:143-149
- Nagai H (1993) Tomate. p. 301-313. *In: Furlani AMC, Viégas GP (Eds). O Melhoramento Genético de Plantas no Instituto Agronômico. Instituto Agronomico de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil*
- Nagata T, Inoue-Nagata AK, Prins M, Goldbach R, Peters D (2000) Impeded thrips transmission of defective *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Virology* 90:454-459
- Paterson RG, Scott SJ, Gergerich RC (1989) Resistance of two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of *Tomato spotted wilt virus*. *Euphytica* 43:173-178
- Resende RO, Haan P, de Avila AC, Kitajima EW, Kormelink R, Goldbach R, Peters D (1991) Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *J of Gen Virol* 72: 2375-2383
- Roselló S, Diez MJ, Lacasa A, Jordá C, Nuez F (1997) Testing resistance to TSWV introgressed from *Lycopersicon peruvianum* by artificial transmission techniques. *Euphytica* 98:93-98
- Roselló S, Diez MJ, Nuez F (1998) Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *Eur J Plant Pathol* 104:499-509
- Roselló S, Soler S, Diez MJ, Rambla JL, Richarte C, Nuez F (1999) New sources for high resistance of *Tomato spotted wilt virus* from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Breed* 118:425-429
- Silberschmidt KM (1937) A doença de vira-cabeça do fumo. *O Biológico* 3:183-184
- Smiech M, Rusinowski Z, Malepszy S, Niemirowicz-Szczytt K (2000) New RAPD markers of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Acta Phys Plantarum* 22: 299-303
- Soler S, Cebolla-Cornejo J, Nuez F (2003) Control of diseases induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. *Phytopathol Mediterr* 42: 207-219
- Spasova MI, Prins TW, Folkertsma RT, Klein-Lankhorst RM, Hille J, Goldbach RW, Prins M (2001) The tomato gene *SW5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance gene and confers resistance to TSWV in tobacco. *Mol Breed* 7:151-161
- Stevens MR, Scott SJ, Gergerich RC (1992) Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum*. *Euphytica* 59:9-17
- Stevens MR, Lamb EM, Rhoads, DD (1995) Mapping the *Sw-5* locus for *Tomato spotted wilt virus* resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theor Appl Gen* 90:451-456
- Stevens MR, Heiny DK, Griffiths PD, Scott JW, Rhoads, DD (1996) Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to the tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance gene *Sw-5*. *TGC Report* 46: 27-28

Stevens MR, Scott SJ, Gergerich RC (1994) Evaluation of seven *Lycopersicon* species for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica* 80:79-84

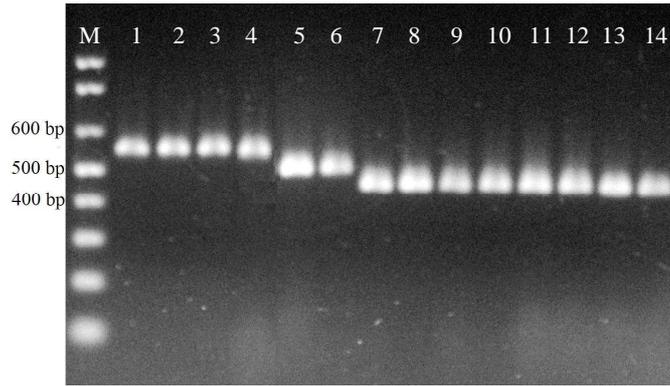
Wijkamp I, Almarza N, Goldbach R, Peters, D (1995) Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85:1069-1074

Williams LV, López-Lambertini PM, Shohara K, Biderbost EB (2001) Occurrence and geographical distribution of tospovirus species infecting tomato crops in Argentina. *Plant Dis* 85:1227-1229

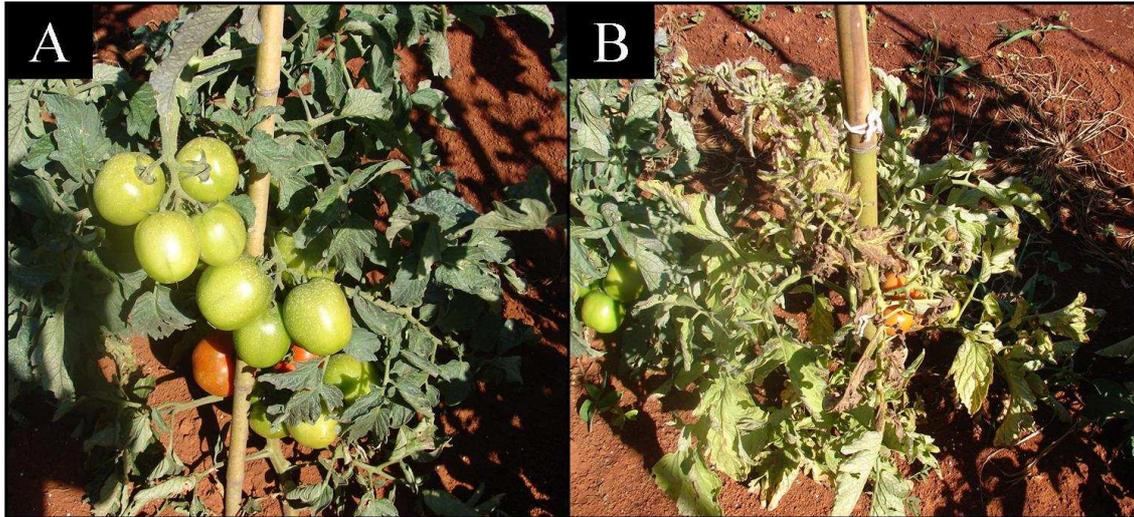
Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci* 10: 621-630

**Table 1.** Codes, sequences, and expected PCR amplicon sizes of a panel of primer pairs derived from the tomato *Sw-5* locus sequence (accession AY 007366). The *Sw-5* gene is known to confer broad-spectrum resistance to *Tospovirus*.

<b>Primer pair code</b>	<b>Primer pair sequence</b>	<b>Amplicon size</b>
'Sw-5-1'	F= 5'-TTTGGAGGTTTGGAGGAAGAAGAG-3' R= 5'-TCATGTCCGACCCAATACCTAACT-3'	409 bp
'Sw-5-2'	F= 5'-AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT-3' R= 5'-TTCCGCATCAGCCAATAGTGT-3'	574 bp
'Sw-5-3'	F= 5'-GAATCTGTTTATGAGTGCGACCTT-3' R= 5'-ACACCCTCTTCTCCTCCAAACCT-3'	418 bp
'Sw-5-4'	F= 5'-TTTTGCAAGAACATCATCAGTA-3' R= 5'-GGCGAAAATCCCAACAAG-3'	538 bp
'Sw-5-5'	F= 5'-AGTCTCCAAACATTCCTGCTTCTC-3' R= 5'-TTCTTTTGCCTGATTCCTTAGTCG-3'	416 bp
'Sw-5-6'	F= 5'-AATTCTTTCGGTTACAA-3' R= 5'-CCGCCTCTGAATACAAAGTCGTCT-3'	496 bp
'Sw-5-7'	F= 5'-TCGCAACGTAATAAAGTCCCACAT-3' R= 5'-ACATACTTCAACAACCTAAACTCC-3'	436 bp

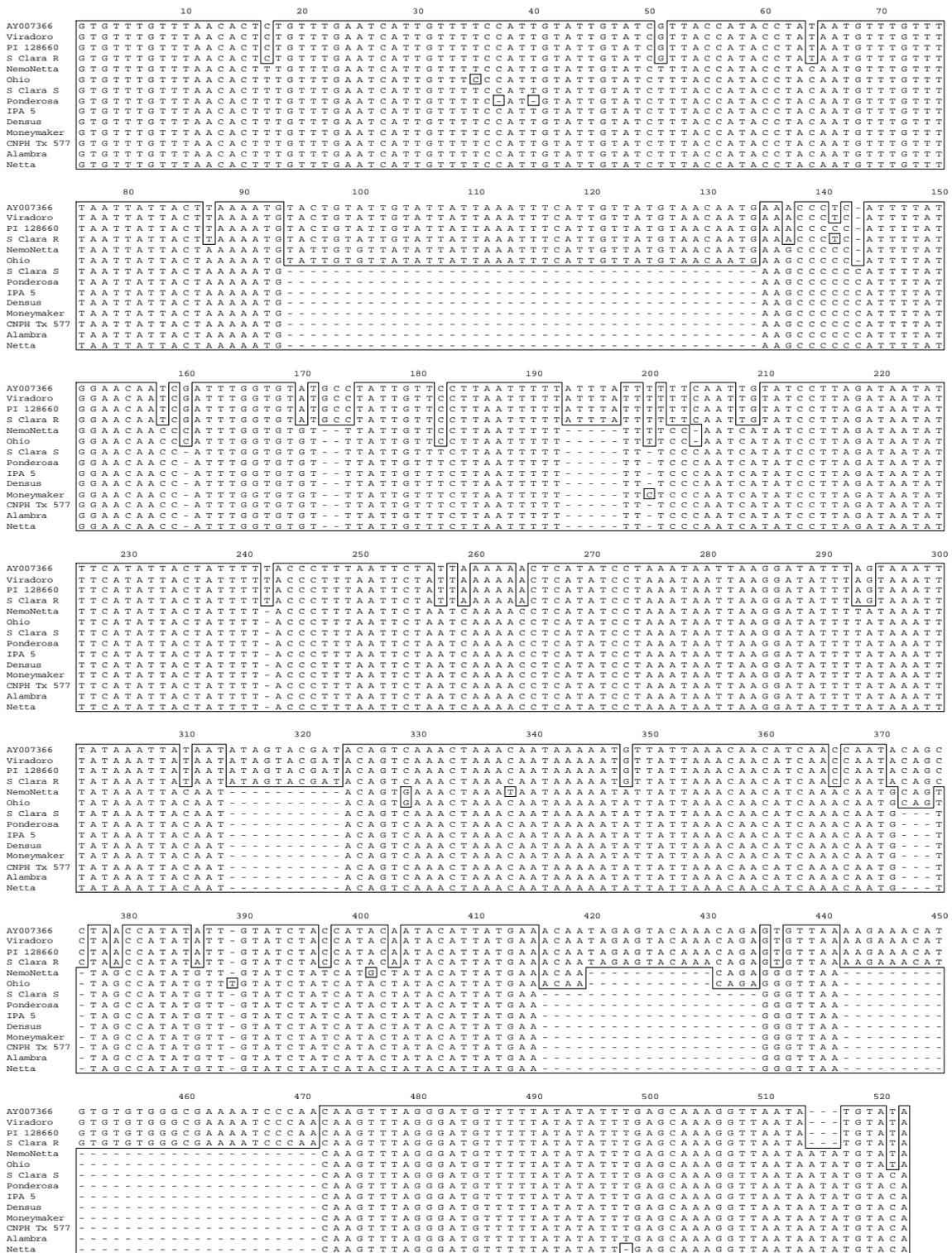


**Fig. 1** – PCR amplification profile (in 1% agarose gel in TBE buffer) obtained with the ‘Sw-5-2’ primer pair. PCR assays were carried out using as template genomic DNA extracted from 14 *Solanum* (section *Lycopersicon*) accessions. **M** = 1 kb ladder (Invitrogen); **1**= ‘Stevens’ (breeding source of the *Sw-5 Tospovirus* resistance locus); **2**= ‘Viradoro’ (contains the *Sw-5* locus and it is near-isogenic to ‘IPA-5’); **3** = *Solanum peruvianum* ‘PI 128660’ (found to be resistant to tospovirus isolates in the USA); **4** = ‘Santa Clara R’ (Santa Cruz type inbred line with the *Sw-5* locus and near-isogenic to ‘Santa Clara S’); **5**= inbred line derived from the hybrid ‘NemoNetta’ (susceptible to tospovirus); **6** = ‘Ohio 8245’ (susceptible to tospovirus); **7** = ‘Santa Clara S’ (Traditional Brazilian Santa Cruz type cultivar and highly susceptible to tospovirus); **8** = ‘Ponderosa’ (very old obsolete fresh-tomato cultivar, susceptible to tospovirus); **9** = ‘IPA-5’ (processing type highly susceptible to tospovirus); **10** = inbred line derived from the hybrid ‘Densus’ (long-shelf life type susceptible to tospovirus); **11**= ‘Moneymaker’ (introgression-free obsolete tomato susceptible cultivar); **12**= ‘CNPH Tx-577’ (susceptible cherry tomato type); **13**= susceptible inbred line derived from the hybrid ‘Alambra’ (long-shelf life type); **14** = susceptible inbred line derived from the hybrid ‘Netta’ (long-shelf life type). The first ‘Sw-5-2’ PCR pattern group (**lanes 1-4**) generated an amplicon of ca. 574 bp. The second group (**lanes 5-6**) displayed an amplicon of ca. 510 bp. The third phenotype group (**lanes 7-14**) displayed an amplicon of ca. 464 bp.



**Fig. 2** – Field reaction to *Groundnut ringspot virus* (GRSV) of (A) ‘Santa Clara R’ near-isogenic line (without GRSV symptoms), which was homozygous for the resistant *Sw-5*-derived amplicon obtained after PCR assays using the ‘Sw-5-2’ primer pair and (B) ‘Santa Clara S’ near-isogenic backcross line (displaying apical necrosis and stunting due to GRSV infection), which was homozygous for the susceptible *Sw-5*-derived amplicon obtained after PCR assays using the ‘Sw-5-2’ primer pair. This primer pair was designed to match sequences of the tomato *Sw-5* (tospovirus resistance) locus.





**Fig. 4** – Sequence comparison of segments of PCR amplicons obtained with the ‘Sw-5-2’ primer pair using as template genomic DNA extracted from 14 *Solanum* (section *Lycopersicon*) accessions. The primer pair sequence is derived from the tomato ‘Stevens’, source of the *Sw-5* locus, which was introgressed from *Solanum peruvianum* (GenBank AY 007366). The following resistant (R) and susceptible (S) accessions were analyzed: ‘Stevens’ (R); ‘Viradoro’ (R); *Solanum peruvianum* ‘PI 128660’ (R); ‘Santa Clara R’ (R); one inbred line derived from the hybrid ‘NemoNetta’ (S); ‘Ohio 8245’ (S); ‘Santa Clara S’ (S); ‘Ponderosa’ (S); ‘IPA-5’ (S); one inbred line derived from the hybrid ‘Densus’ (S); ‘Moneymaker’ (S); ‘CNPH Tx-577’ (S); one inbred line derived from the hybrid ‘Alambra’ (S) and one inbred line derived from the hybrid ‘Netta’ (S).