

DOUGLAS LAU

**ANÁLISE MOLECULAR DA INTERAÇÃO ENTRE *Tospovirus*
E O GENE DE RESISTÊNCIA *Sw-5***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

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

T

L366a
2004

Lau, Douglas, 1975-

Análise molecular da interação entre *Tospovirus* e o gene de resistência Sw-5 / Douglas Lau. – Viçosa : UFV, 2004

ix, 92f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Solanaceae - Resistência a *Tospovirus*.
 2. *Lycopersicon esculentum*.
 3. *Lycopersicon peruvianum*.
 4. *Nicotiana benthamiana*.
 5. *Nicotiana Tabacum*.
 6. Vírus do vira-cabeça do tomateiro.
 7. Plantas transgênicas.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 635.64298

DOUGLAS LAU

**ANÁLISE MOLECULAR DA INTERAÇÃO ENTRE *Tospovirus*
E O GENE DE RESISTÊNCIA *Sw-5***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de março de 2004.

Prof. Francisco Murilo Zerbini Jr.
(Conselheiro)

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Conselheiro)

Prof. Ivan de Godoy Maia

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais.

À minha irmã Denise

À minha esposa Miki.

AGRADECIMENTO

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, por oportunizar o aprendizado da interessante área da interação planta-patógeno e pelos conhecimentos em técnicas moleculares.

Ao amigo Júlio Cezar Franco de Oliveira, pela amizade, pelo apoio, pelo legado e pelo interesse por este trabalho.

Aos amigos, o “cubano elétrico” Miguel Angel Dita Rodríguez e o “gaúcho pensante”, Júlio César de Lima, cujo entusiasmo e ideal científico desencadeou inúmeras e proveitosas discussões.

Aos companheiros diretamente envolvidos na linha de pesquisa do *Sw-5*: o “nordestino arretado” Gaus Andrade de Lima e o “mineirinho” Lúcio Mauro Guimarães, os quais cada um ao seu peculiar jeito de ser, contribuiu e forneceu peças importantes na montagem deste quebra-cabeça.

Ao Edgar Paulino, Sofia, Vanessa, Janaína, Leonardo e Gustavo, que me permitiram a alegria de ensinar e que ajudaram na montagem de inúmeros experimentos.

Ao professor e conselheiro Francisco Murilo Zerbini Jr., sempre disponível para opinar sobre os experimentos e cuja eficiência e rapidez viabilizaram o término desta obra.

Ao professor e conselheiro Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pelas ricas discussões nos mais variados temas.

Aos amigos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Patologia Florestal / Genética da Interação Planta-Patógeno e do recém-formado Laboratório de Genômica.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela formação científica e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

E por último e em especial, à minha esposa Miki, a “japoneisinha” que participou diretamente dos aspectos científicos e emocionais deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	
HIPERSENSIBILIDADE E NECROSE SISTÊMICA EM <i>Nicotiana benthamiana</i> TRANSFORMADA COM O GENE <i>Sw-5</i> DE TOMATEIRO.....	4
RESUMO.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
Isolados virais e inoculação.....	6
Transformação genética de <i>Nicotiana benthamiana</i>	7
Determinação da presença do transgene.....	8
Análise de segregação e funcionalidade do transgene.....	8
RESULTADOS.....	9
Transformação genética de <i>Nicotiana benthamiana</i> e análise de segregação do transgene.....	9
Análise do espectro da resistência.....	10
DISCUSSÃO.....	13
LITERATURA CITADA.....	16

CAPÍTULO 2	
PROTEÍNA NSs DE TOSPOVÍRUS INDUZ NECROSE EM SOLANÁCEAS INDEPENDENTEMENTE DA PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA <i>Sw-5</i> .	22
RESUMO	22
INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	26
Material vegetal, isolados e inoculação de tospovírus	26
Clonagem dos genes <i>N</i> , <i>NSm</i> e <i>NSs</i> de tospovírus no vetor pGR106	27
Inoculação das plantas com os clones recombinantes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
Confirmação da expressão transitória dos genes de tospovírus em <i>Nicotiana benthamiana</i>	30
Confirmação da expressão transitória da proteína N de tospovírus em <i>Nicotiana benthamiana</i>	30
Gama de hospedeiros de PVX:: <i>NSs</i>	31
Seqüenciamento dos genes <i>N</i> , <i>NSm</i> e <i>NSs</i> e análise comparativa do gene <i>NSs</i> do isolado AL	31
RESULTADOS	32
Efeito da expressão isolada de genes de tospovírus em <i>Nicotiana benthamiana</i> ...	32
Confirmação da expressão transitória da proteína N de tospovírus em <i>Nicotiana benthamiana</i>	36
Gama de hospedeiros de PVX:: <i>NSs</i>	36
Análise da proteína NSs do isolado AL	38
DISCUSSÃO	42
LITERATURA CITADA	46
CAPÍTULO 3	
INTERFERÊNCIA NA RESISTÊNCIA MEDIADA POR <i>Sw-5</i> , POR MEIO DA CO-EXPRESSIONE TRANSITÓRIA DE VERSÕES TRUNCADAS DO GENE	53
RESUMO	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODOS	56
Material vegetal, isolados e inoculação de tospovírus	56
Clonagem da região 5' de <i>Sw-5</i> em pGR106	56
Inoculação das plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> com clones de PVX	57

<i>Northern blot</i>	58
RESULTADOS	59
Avaliação da resistência a tospovírus em plantas da linhagem B5-5 inoculadas com os clones recombinantes PVX::FP12S e PVX::FP12AS	59
Detecção dos RNAs virais recombinantes em tecidos de <i>Nicotiana benthamiana</i> por análise de <i>Northern blot</i>	62
DISCUSSÃO	63
LITERATURA CITADA	66
CAPÍTULO 4	
ANÁLISE FUNCIONAL EM TOMATEIRO E TABACO DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS AO GENE <i>Sw-5</i> , CLONADAS POR MEIO DE PCR	
RESUMO	69
INTRODUÇÃO	70
MATERIAL E MÉTODOS	71
Isolados e inoculação de tospovírus	71
Clonagem e sequenciamento de um homólogo de <i>Sw-5</i> proveniente do acesso LA371-20 de <i>Lycopersicon peruvianum</i>	72
Transferência de homólogos de <i>Sw-5</i> para o vetor binário pBI121	72
Avaliação da resistência a tospovírus	73
Determinação da presença do transgene por meio de PCR.....	74
RESULTADOS	75
Sequenciamento de um homólogo do gene <i>Sw-5</i> e análise da região genômica do acesso LA371-20 que confere resistência a tospovírus	75
Confirmação dos transformantes de tabaco e tomateiro e avaliação da resistência a tospovírus	80
DISCUSSÃO	82
LITERATURA CITADA	85
CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

RESUMO

LAU, Douglas, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2004. **Análise molecular da interação entre *Tospovirus* e o gene resistência *Sw-5***. Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Francisco Murilo Zerbini Jr. e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Alguns aspectos da interação entre o gene de resistência *Sw-5* e os tospovírus, foram analisados neste trabalho. A capacidade de *Sw-5* conferir resistência em *Nicotiana benthamiana* foi avaliada em plantas transformadas com uma construção na qual a ORF e a região 3' do gene estavam sob controle do promotor 35S. As plantas transformadas foram resistentes à infecção por tospovírus. A comparação do espectro da resistência destas plantas com o observado para outras solanáceas, indica que as vias de sinalização e as respostas de defesa ativadas por *Sw-5* estão conservadas nesta família, e que o polimorfismo genético nos componentes das vias de transdução de sinais pode resultar em diferentes níveis de resistência. A fim de identificar o gene de avirulência dos tospovírus, os genes *N*, *NSm* e *NSs*, foram expressos isoladamente ou em combinações, por meio do vetor viral PVX, em plantas com *Sw-5*. A expressão destes genes não foi capaz de desencadear a resposta de hipersensibilidade e tampouco interferiu na infecção da planta por PVX. Portanto, outro componente dos tospovírus deve ser responsável pelo desencadeamento da reação de resistência. Independentemente da presença do gene *Sw-5*, a expressão do gene *NSs* por meio do PVX, agravou os sintomas provocados por este vírus em algumas solanáceas, o que pode ter relação com a capacidade desta proteína de suprimir silenciamento gênico. Em

plantas com *Sw-5*, a co-expressão da região 5' deste gene por meio do vetor PVX, favoreceu a infecção sistêmica por tospovírus. Uma vez que o efeito foi observado tanto para expressão senso quanto anti-senso, a redução dos níveis de mRNA de *Sw-5* provocada por silenciamento gênico, poderia ser a causa desta interferência na resistência, embora a análise de *Northern blot* não tenha demonstrado tal redução. Uma seqüência homóloga a *Sw-5* contendo uma ORF sem deleções ou interrupções prematuras foi clonada a partir do acesso LA371-20 de *Lycopersicon peruvianum*. Análises moleculares demonstraram que esta seqüência é originada do loco *Sw-5* ou de região próxima a este e que segrega com a resistência a tospovírus. A capacidade deste e de outros três homólogos oriundos de distintos acessos de tomateiro de conferir resistência a tospovírus, foi avaliada em plantas transgênicas de tomateiro e tabaco. As plantas transformadas foram suscetíveis ao vírus. A não-funcionalidade destes homólogos pode ser devido à estrutura das construções utilizadas na transformação. Alternativamente, outros homólogos presentes nestes acessos de tomateiro podem ser os responsáveis pela resistência.

ABSTRACT

LAU, Douglas, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2004. **Molecular analysis of the tospovirus – Sw-5 resistance gene interaction.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee members: Francisco Murilo Zerbini Jr. and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

In this work some aspects of the tospovirus - *Sw-5* interaction was analyzed. The capacity of the *Sw-5* to confer resistance in *Nicotiana benthamiana* was evaluated in transgenic plants transformed with *Sw-5* ORF containing its own 3' UTR region under 35S promoter control. Transgenic plants were resistant to tospovirus infection. Comparisons of the resistance spectrum with other members of the *Solanaceae* suggest that the signal transduction pathways and resistance responses triggered by *Sw-5* are conserved in solanaceae and that the genetic polymorphism in the signal transduction components may result in different resistance levels. The *N*, *N_{Sm}* and *N_{Ss}* genes isolated or in combination were expressed by PVX vector in plants harboring *Sw-5* in order to detect the tospovirus avirulence gene. These genes were not able to trigger the hypersensitive response and to affect PVX infection in *Sw-5* plants, which suggest that another tospovirus component is the elicitor of the resistance response. Independently of the *Sw-5* gene, PVX clones harboring *N_{Ss}* gene induced more severe symptoms in some solanaceae plants. Gene silencing may be the cause of this symptoms. In transgenic plants harboring *Sw-5* gene, the co-expression of the 5' region of this gene by PVX favored tospovirus infection. As this effect was observed both for 5' sense and anti-sense constructions it is possible that it has been caused by reduction on mRNA levels

by gene silencing, although *Northern blot* analysis did not agree with this hypothesis. An *Sw-5* homolog was cloned from LA371-20 accession. This homolog is localized in or near of *Sw-5* locus and segregated with tospovirus resistance. The capacity of this and other three homologs originated from others accessions to confer tospovirus resistance was evaluated in tobacco and tomato transgenic plants. All the transformants were susceptible to the virus. Other homologs presents in the different accessions evaluated may be responsible for the resistance, although problems in the structure of the constructions can not be discarded.

INTRODUÇÃO

Os vírus de planta que apresentam genoma segmentado, composto por três RNAs, envolto por um envelope lipídico e que são transmitidos por tripses (Thysanoptera: Thripidae) estão incluídos no gênero *Tospovirus* (família Bunyaviridae). Presentes nos diversos continentes, espécies de tospovírus causam doenças em plantas de várias famílias (German et al., 1992; Peters et al., 1996).

As partículas dos tospovírus são delimitadas por um envelope lipídico, que contém glicoproteínas e apresentam formato esférico ou quase esférico, com diâmetro entre 80 - 120 nm (German et al., 1992). No interior da partícula, além da polimerase viral, estão os três RNAs genômicos: RNA L, RNA M e RNA S. O RNA L do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (espécie-tipo do gênero) apresenta 8.897 nucleotídeos e contém uma única ORF, codificada no sentido complementar ao da fita viral. O produto desta ORF é uma proteína de 331,5 kDa que contém motivos típicos das RNA polimerases-RNA dependentes (De Haan et al., 1991). O RNA M apresenta 4.821 nucleotídeos e codifica, a partir da fita viral, uma proteína de 33,6 kDa, denominada NSm e, a partir da fita complementar a viral, uma proteína de 127,4 kDa. Esta última é a precursora das duas glicoproteínas, G1 e G2, constituintes do envelope viral (Kormelink et al., 1992a). O RNA S apresenta 2.916 nucleotídeos, codifica a partir da fita viral, a proteína NSs de 52,4 kDa e, a partir da fita complementar, a proteína N de 29 kDa, que envolve os RNAs virais compondo o nucleocapsídeo (De Haan et al., 1990).

As epidemias de tospovírus ocorrem quando condições ambientais favoráveis permitem a co-existência de espécies de tripes vetoras do vírus e de plantas hospedeiras (do vírus e do vetor) (German et al., 1992). A oviposição de fêmeas adultas em plantas infectadas por tospovírus, permite que as larvas de primeiro estágio adquiram o vírus (Ullman et al., 1992), iniciando o ciclo de infecção. As glicoproteínas do envelope, aparentemente, estão envolvidas no processo de aquisição do vírus pelo vetor (Bandla et al., 1998; Kikkert et al., 1998). O vírus, que é capaz de replicar ativamente nas células do vetor (Ullman et al., 1993), acumula-se na glândula salivar do tripe adulto (Wijkamp et al., 1993), o qual torna-se transmissor do vírus. Ao se alimentar sobre uma planta sadia, o tripe transmissor introduz as partículas virais na célula vegetal. Uma vez no interior da célula, as unidades da polimerase viral carregadas com a partícula iniciam a transcrição, produzindo os RNAs mensageiros que originam as proteínas virais. A transcrição ocorre por *cap-snatching* (Kormelink et al., 1992b), um processo em que sequências clivadas da região 5' de RNAs mensageiros do hospedeiro atuam como iniciadores da síntese de RNA viral. O acúmulo da proteína N nas células determina a mudança da fase de transcrição para replicação, na qual são produzidos os RNAs genômicos (Van Poelwijk et al., 1996). Estes RNAs são encapsidados pela proteína N, formando os nucleocapsídeos e podem ser transportados para as células vizinhas ou serem envolvidos pelo envelope. A movimentação célula-a-célula é mediada pela proteína NSm e ocorre por meio da formação de túbulos através dos plasmodesmas (Kormelink et al., 1994; Storms et al., 1995). No processo de montagem da partícula viral, as glicoproteínas G1 e G2 que se acumulam no sistema de Golgi, intermedeiam o envolvimento dos nucleocapsídeos pelo sistema de membranas da célula; posteriormente, os nucleocapsídeos envelopados migram para o retículo endoplasmático (Kikkert et al., 1999). Após a montagem, as partículas estão aptas a serem adquiridas pelos tripes e transmitidas para outras plantas, completando, assim, o ciclo de infecção.

O fato de os tospovírus serem os únicos membros da família Bunyaviridae capazes de infectar plantas, sugere que derivam de um vírus ancestral que infectava animais e que adquiriu a capacidade de infectar novos hospedeiros. A aquisição do gene *NSm* pode ter sido o grande passo evolutivo que deu origem a este grupo (Goldbach e Peters, 1994). Este gene, ausente nos demais gêneros da família, codifica para a proteína de movimento, elemento imprescindível aos vírus de planta. Outro componente que pode ser fundamental ao processo de patogênese em plantas, é a proteína NSs que é capaz de suprimir o silenciamento gênico (Takeda et al., 2002). Como o silenciamento

gênico é um mecanismo de defesa de plantas a vírus, as proteínas virais inibidoras deste processo são um contra-ataque necessário a infecção viral (Vance e Vaucheret, 2001).

Além do silenciamento gênico, a resistência relacionada à resposta de hipersensibilidade é um mecanismo de defesa das plantas para evitar a infecção viral. Entre os genes envolvidos na ativação da resposta de hipersensibilidade, estão o gene de resistência (da planta) e o gene de avirulência (do patógeno). A proteína, codificada pelo gene de resistência, tem a dupla função de reconhecer a presença do patógeno em tecidos hospedeiros e desencadear as vias de transdução de sinais que ativam as respostas de defesa (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Martin et al., 2003). A conservação da estrutura entre as proteínas de resistência, é reflexo destas funções que exercem em comum. Entre as proteínas codificadas pelos diferentes genes de avirulência não existe similaridade na estrutura, sendo, a proteína de avirulência, uma entre as várias proteínas do patógeno que passou a ser reconhecida pela planta. Originário do tomateiro selvagem *Lycopersicon peruvianum*, o gene *Sw-5* confere resistência a tospovírus em tomateiro, tabaco e berinjela (Stevens et al., 1992; Brommonschenkel et al., 1998 e 2000; Picoli et al., 1999; Lima et al., 2000). Nestas espécies, as plantas com *Sw-5* exibem reações necróticas no sítio de infecção e inibem a infecção sistêmica do vírus. A estrutura da proteína codificada por *Sw-5* contendo domínios NBS (*nucleotide binding site*) e LRR (*leucine rich repeats*) típicos das proteínas de resistência e o fenótipo da resistência sugerem a sua atuação no reconhecimento de algum componente viral e ativação da resposta de hipersensibilidade.

Neste trabalho dividido em quatro capítulos, alguns aspectos da interação tospovírus – *Sw-5* foram analisados. No Capítulo 1, é avaliada a capacidade do gene *Sw-5* ativar respostas de defesa a tospovírus em *Nicotiana benthamiana*. O Capítulo 2 é destinado à análise de três genes de tospovírus e sua possível interação com *Sw-5*. O Capítulo 3 trata da interferência na resistência mediada por *Sw-5* por meio da co-expressão transitória da região 5' do gene, discutindo-se os possíveis mecanismos envolvidos neste processo. No Capítulo 4, relata-se a clonagem de um homólogo de *Sw-5* e seu possível papel na resistência a tospovírus.

CAPÍTULO 1

HIPERSENSIBILIDADE E NECROSE SISTÊMICA EM *Nicotiana benthamiana* TRANSFORMADA COM O GENE *Sw-5* DE TOMATEIRO

Douglas Lau¹, Julio Cezar Franco de Oliveira², Elene Yamazaki Lau¹, Sérgio Hermínio Brommonschenkel¹

¹Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG; Brasil; ²Dep. Tecnologia, UNESP-Jaboticabal. (Autor para correspondência: shbromo@ufv.br).

RESUMO

O gene *Sw-5*, originário do tomateiro, confere resistência a várias espécies de tospovírus e codifica uma proteína contendo os domínios NBS (*nucleotide binding site*) e LRR (*leucine rich repeats*). Plantas de tomate, tabaco e berinjela com *Sw-5*, exibem reações necróticas nas folhas inoculadas com tospovírus. Estas reações e a estrutura da proteína *Sw-5*, indicam que a resistência ocorre por meio do reconhecimento de elicitores do patógeno e desencadeamento da resposta de hipersensibilidade. O objetivo deste estudo foi verificar a funcionalidade do gene *Sw-5* em *Nicotiana benthamiana*. Uma construção, que contém a ORF *Sw-5* sob controle do promotor 35S do CaMV e sua respectiva região 3' não-traduzida com o provável sinal de poliadenilação, foi utilizada para transformação de *N. benthamiana* via *Agrobacterium tumefaciens*. Plantas de progênies oriundas da autofecundação de transformantes primários, foram inoculadas com um isolado de tospovírus e avaliadas quanto à ocorrência de reação de hipersensibilidade e resistência à infecção sistêmica. Em uma progênie com segregação típica para uma inserção do transgene, foi selecionada uma planta homozigota (B5-5), e sua progênie utilizada para avaliação do espectro da resistência a tospovírus. O gene *Sw-5* é funcional em *N. benthamiana*, e plantas que contém o transgene exibem resposta de hipersensibilidade 48 horas após a inoculação, sendo resistentes à infecção sistêmica. O fenótipo da resistência, no entanto, é dependente do isolado viral, uma vez que um dos isolados analisados causou necrose sistêmica dos tecidos em todas as plantas inoculadas. Existe equivalência na funcionalidade deste gene entre as diferentes espécies desta família, pois o isolado causador de necrose sistêmica em *N. benthamiana* apresenta tendência a causar infecção sistêmica em tomateiro, berinjela e tabaco. Estes resultados sugerem que as vias de transdução de sinais e as respostas de defesa ativadas por *Sw-5* apresentam-se conservadas entre os membros da família Solanaceae.

Palavras-chave: resistência a vírus, expressão heteróloga, transdução de sinais.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Tospovirus* (família Bunyaviridae) têm sido descritas como agentes causais de doenças em ampla gama de hospedeiros em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (German et al., 1992; Peters et al., 1996). Entre as espécies de tospovírus descritas, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), são capazes de infectar tomateiro e outras solanáceas causando a doença conhecida como “vira-cabeça” (Lopes e Santos, 1994; Kurozawa e Pavan, 1997; Bezerra et al., 1999; Lima et al., 2002).

Sw-5 é um gene originário do tomateiro selvagem *Lycopersicon peruvianum*, que confere resistência a várias espécies de tospovírus. Originalmente, a resistência mediada por *Sw-5* foi considerada dominante com penetrância incompleta (Stevens et al., 1992; Boiteux e Giordano, 1993). Fenotipicamente, a resistência é manifestada pela ausência de sintomas ou pelo aparecimento de lesões necróticas nas folhas inoculadas (Stevens et al., 1992). Estudos envolvendo enxertia sugerem que *Sw-5* atua contendo o vírus no sítio de infecção (Lau, 2001).

O gene *Sw-5* codifica uma proteína de 1.246 aminoácidos, contendo domínios NBS (*nucleotide binding site*) e LRR (*leucine rich repeats*) (Brommonschenkel et al., 2000). Estas características estruturais são típicas de proteínas envolvidas na resposta de resistência a fitopatógenos (Martin et al., 2003). A proteína *Sw-5* faz parte de uma classe que inclui, entre outras, as proteínas Mi (Milligan et al., 1998), I2C (Ori et al., 1997), RPM1 (Grant et al., 1995), Prf (Salmeron et al., 1996) e Rx (Bendahmane et al., 1999), que conferem resistência a nematóides, fungos, bactérias e vírus, respectivamente.

Análises genéticas de diversas interações planta-patógeno demonstram que a resistência pode ser dependente de uma relação específica entre um gene da planta (gene R) e um gene de avirulência do patógeno (gene Avr) (Flor, 1971), o que, segundo análises moleculares, estruturais e funcionais das proteínas codificadas por estes genes, pode ser explicado pelo modelo receptor-ligante (Staskawicz et al., 1995, Staskawicz, 2001). Segundo este modelo, a proteína codificada pelo gene R atua como receptor (direto ou indireto) da proteína codificada pelo gene de avirulência. Em consequência deste reconhecimento, ocorreria o desencadeamento de cadeias de transdução de sinais, que ativariam diversos mecanismos de defesa, restringindo o patógeno ao sítio de

infecção (Baker et al., 1997; Innes, 1998; Somssich e Halhbroch, 1998). Entre estes mecanismos, inclui-se o aumento intracelular da concentração de formas reativas de oxigênio, o fortalecimento de paredes celulares, a produção de substâncias antimicrobianas e proteínas PR (proteínas relacionadas à patogênese), bem como de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico, responsáveis por ativar as respostas de defesa em células adjacentes (LAR, *Localized Acquired Resistance*) e tecidos mais distantes do sítio de infecção na planta (SAR, *Systemic Acquired Resistance*) (Hutcheson, 1998; Hammond-Kosack e Jones, 1996; Ryals et al., 1996). Todo este processo pode, muitas vezes, ser visualizado macroscopicamente na forma de lesões necróticas restritas ao sítio de infecção (resposta de hipersensibilidade-HR).

O gene *Sw-5* confere resistência não apenas em espécies e cultivares de tomateiro, mas também em outras espécies da família Solanaceae como o tabaco (*Nicotiana tabacum*) e a berinjela (*Solanum melongena*) (Brommonschenkel et al., 1998; Costa et al., 1999; Lau et al., 1999; Picoli et al., 1999; Lau, 2001). Aparentemente, *Sw-5* não é capaz de conferir resistência em alface (*Lactuca sativa*, uma espécie pertencente à família Asteraceae) (Karasawa, 2001; Yamazaki, 2001). Em tabaco, o espectro da resistência é mais restrito em comparação ao tomateiro (Brommonschenkel et al., 1998; Lau, 2001). A funcionalidade de um gene R em sistema heterólogo é considerada evidência da conservação das vias de transdução de sinais ativada por estes genes. Ao menos em solanáceas, estas vias devem ser conservadas, conforme verificado pela funcionalidade do gene *N* de tabaco em tomate (Whitham et al., 1996), *Pto* de tomate em *N. benthamiana* (Rommens et al., 1995) e *Cf-9* de tomate em tabaco e batata (Hammond-Kosack et al., 1998). Em geral, a conservação das vias de transdução de sinais é restrita a plantas botanicamente relacionadas, sendo este fenômeno denominado “*restricted taxonomic functionality*” (RTF). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a funcionalidade do gene *Sw-5* em *N. benthamiana* e comparar o espectro da resistência com o observado em outras espécies de solanáceas.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados virais e inoculação

Os isolados de tospovírus V1-3 (TCSV), Cb e AL (GRSV) e V2-2, utilizados neste trabalho, são originários do Brasil e fazem parte da coleção do Laboratório de

Genética da Interação-Planta Patógeno (BIOAGRO/UFV), sendo sua identificação baseada no seqüenciamento do gene *N* (nucleocapsídeo). O número de acesso da seqüência do nucleocapsídeo dos isolados é dado a seguir: V1-3 (AF282982), Cb (AF251271) e AL (AF513219). O gene *N* do isolado V2-2 foi apenas parcialmente seqüenciando (seqüência não depositada no GenBank), sendo este isolado mais relacionado à espécie CSNV (Lau, 2001).

Para fins de inoculação, o inóculo original, mantido a -80°C , foi previamente multiplicado em plantas de *Nicotiana tabacum* 'Havana 425'. Folhas infectadas foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,01M e carborundum 600 mesh. O extrato foi esfregado sobre folhas de plantas saudáveis de *N. benthamiana* com auxílio de gaze.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação ou câmara de crescimento e avaliadas a cada dois dias por um período de 14 dias, observando-se o desenvolvimento de sintomas locais e sistêmicos.

Transformação genética de *Nicotiana benthamiana*

Fragmentos foliares de *N. benthamiana* foram transformados, via *Agrobacterium tumefaciens*, com o clone pGPP63. Este clone é constituído da estirpe desarmada LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário pBI121, no qual o gene GUS foi substituído pela ORF Sw-5 (oriunda da linhagem SW99-1 de *Lycopersicon esculentum*). Nesta construção, a ORF Sw-5 está sob o controle do promotor 35S do CaMV e contém sua respectiva região 3' não-traduzida (3'NTR) com provável sítio de poliadenilação (Figura 1) (Lima, 2001; Yamazaki, 2001).

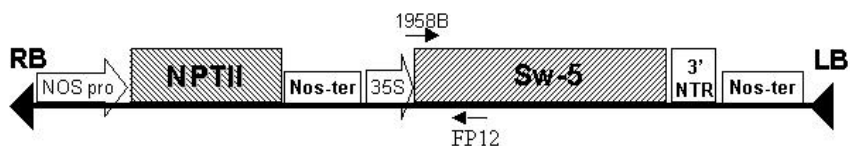


Figura 1 – Representação diagramática do T-DNA da construção pGPP63, derivada do vetor pBI121. RB – borda direita; NOS pro – promotor do gene *nos* de *Agrobacterium tumefaciens*; NPT II – gene da neomicina fosfotransferase II, que confere resistência a canamicina; NOS ter – terminador do gene *nos*; 35S – promotor do RNA 35S do CaMV; Sw-5 – ORF Sw-5; 1958B e FP12 – oligonucleotídeos que pareiam na região 5' do gene *Sw-5*; 3'NTR – região 3' não-traduzida do gene *Sw-5* contendo o possível sinal de poliadenilação; e LB – borda esquerda.

Determinação da presença do transgene

A presença do gene *Sw-5* foi determinada via PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a seqüência transgênica. O DNA das plantas foi extraído de acordo com protocolo de Fulton et al. (1995). A reação de PCR consistiu em 100-200 ng de DNA genômico, 2,5 µL do tampão de reação 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µL da mistura de deoxinucleotídeos (0,01 M de cada dNTP), 0,5 µL do oligonucleotídeo 1958B (10 µM) (5'-GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG-3'), 0,5 µL do oligonucleotídeo FP12 (10 µM) (5'-AGG ATT TGT AGT ACG TCT CAA CTT G-3'), 2 a 5 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase e água estéril (Milli-Q) suficiente para atingir volume final de 25 µL. Os oligonucleotídeos 1958B e FP12 pareiam na região 5' do gene *Sw-5* (Figura 1), permitindo a amplificação de uma seqüência de 1.125 pb somente nas plantas transformadas. Após desnaturação inicial a 94°C por 3 min, a amplificação constituiu de 40 ciclos de desnaturação por 30 seg a 94°C, anelamento por 1 min a 52°C e extensão a 72°C por 2 min. Após os 40 ciclos, foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto da reação foi visualizado sob luz ultravioleta, após corrida eletroforética a 90V, por duas horas, em gel de agarose 1% (TAE 1X) contendo brometo de etídeo.

Análise de segregação e funcionalidade do transgene

As plantas transformadas (R0) foram inoculadas com o isolado V2-2. Aquelas que exibiram reações locais necróticas e não manifestaram sintomas sistêmicos (portanto consideradas resistentes) foram autofecundadas. As sementes, oriundas da autofecundação das plantas R0 que exibiram HR foram, coletadas e utilizadas nos experimentos de análise de segregação. Aproximadamente 20 plantas de cinco progênies R1, foram inoculadas com o isolado V2-2 e avaliadas quanto à ocorrência de HR nas folhas inoculadas, até seis dias após a inoculação. O ajuste das proporções de plantas resistentes:suscetíveis ao modelo genético hipotetizado, foi avaliado pelo teste do qui-quadrado. Plantas resistentes de uma progênie que apresentou segregação típica para uma única inserção, foram autofecundadas e as progênies R2 foram inoculadas, visando identificar plantas R1 homozigotas. Uma planta R1 homozigota foi selecionada e o espectro da resistência avaliado em sua descendência, mediante a inoculação dos quatro isolados de tospovírus (V1-3, Cb, AL e V2-2).

RESULTADOS

Transformação genética de *Nicotiana benthamiana* e análise de segregação do transgene

Dos 20 transformantes primários (R0), aclimatados em casa de vegetação e inoculados com o isolado viral V2-2, três apresentaram sintomas idênticos às plantas não-transformadas de *N. benthamiana*, consistindo em lesões cloróticas em anel no sítio de inoculação e infecção sistêmica caracterizada por clorose e necrose nas nervuras. Dezesete plantas manifestaram reações locais típicas de resposta de hipersensibilidade (HR). Destas plantas, porém, 11 manifestaram sintomas sistêmicos até a época do florescimento. Estes sintomas foram de natureza necrótica, diferindo dos sintomas observados em plantas não-transformadas.

Cinco progênes R1 foram avaliadas quanto à segregação da resistência. Considerando o nível de significância de 5% pelo teste de χ^2 , as progênes oriundas de B2, B5 e B9, apresentaram padrão de segregação indicativo de uma única inserção do transgene (Tabela 1). Dentro da progênie B5, uma planta R1 homocigota foi selecionada (B5-5) e sua progênie utilizada nos ensaios de determinação do espectro da resistência. Por meio de PCR, utilizando os oligonucleotídeos 1958B e FP12, foi amplificado um fragmento de 1.125 pb correspondente à região 5' do gene *Sw-5*, confirmando a presença do transgene em B5-5 (Figura 2).

Tabela 1 – Segregação da resistência ao isolado de tospovírus V2-2 em progênes oriundas da autofecundação de plantas de *Nicotiana benthamiana*, transformadas com a construção pGPP63.

Progênie	Fenótipos observados		Hipótese**	Proporção esperada		χ^2	P%
	R*	S*		R	S		
B2	15	5	3:1	15	5	0	100
B5	15	5	3:1	15	5	0	100
B9	12	8	3:1	15	5	2,4	12,13
B13	8	11	3:1	14,25	4,75	10,97	0,09
B18	9	8	3:1	12,75	4,25	4,41	3,57

* R - presença de HR nas folhas inoculadas; S - ausência de HR nas folhas inoculadas.

** Considerando uma inserção do transgene e dominância completa.

Análise do espectro da resistência

A progênie da planta homocigota B5-5 foi inoculada com os quatro isolados de tospovírus. Das 40 plantas avaliadas (10 para cada isolado), todas exibiram sintomas locais necróticos dois dias após a inoculação (Figura 3B, Tabela 2). As lesões induzidas por V1-3 apresentaram aspecto distinto das demais, não sendo tão evidentes e alternando regiões necróticas com áreas cloróticas. Nas plantas não-transformadas, os sintomas locais só foram observados sete dias após a inoculação. Estes foram de natureza clorótica, muitas vezes na forma de anéis concêntricos (Figura 3A). Dez dias após a inoculação, todas as plantas não-transformadas exibiam sintomas sistêmicos típicos de infecção por tospovírus: clorose no limbo e nervuras, leve necrose em alguns pontos da haste e deformação foliar (Figura 3D). Nas plantas transformadas, houve diferenças quanto à capacidade de restrição da infecção sistêmica dos diferentes isolados. Plantas inoculadas com V2-2, AL e Cb, apresentaram apenas sintomas locais, enquanto todas as plantas inoculadas com V1-3 apresentaram sintomas sistêmicos (Figura 3C, Tabela 2). Estes foram de natureza necrótica e, portanto, diferentes daqueles observados em plantas não-transformadas.

Tabela 2 – Frequência dos diferentes sintomas exibidos por plantas de *Nicotiana benthamiana* não-transformadas e plantas da progênie B5-5 inoculadas com quatro isolados de tospovírus.

Sintomas	<i>N. benthamiana</i> (não-transformada)				B5-5 (<i>Sw-5/Sw-5</i>)			
	V1-3	V2-2	AL	Cb	V1-3	V2-2	AL	Cb
HR	0/7*	0/10	0/5	0/6	10/10	10/10	10/10	10/10
Lesões cloróticas/ mosaico	7/7	10/10	5/5	6/6	0/10	0/10	0/10	0/10
Necrose sistêmica	0/7	0/10	0/5	0/6	10/10	0/10	0/10	0/10

* Plantas com sintomas / total de plantas inoculadas.

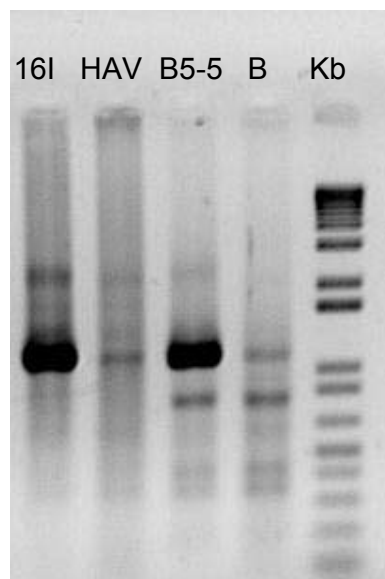


Figura 2 – Confirmação da presença de *Sw-5* em B5-5 por meio de PCR. A presença do transgene foi verificada utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B e FP12 que pareiam na região 5' do transgene. 16I - Linhagem de *Nicotiana tabacum* com o clone cosmídeo TC134-8 que contém o gene *Sw-5*; HAV – Planta de *N. tabacum* não-transformada; B5-5 - planta de *N. benthamiana* transformada com o clone pGPP63. B – Planta de *N. benthamiana* não-transformada; Kb – Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder.

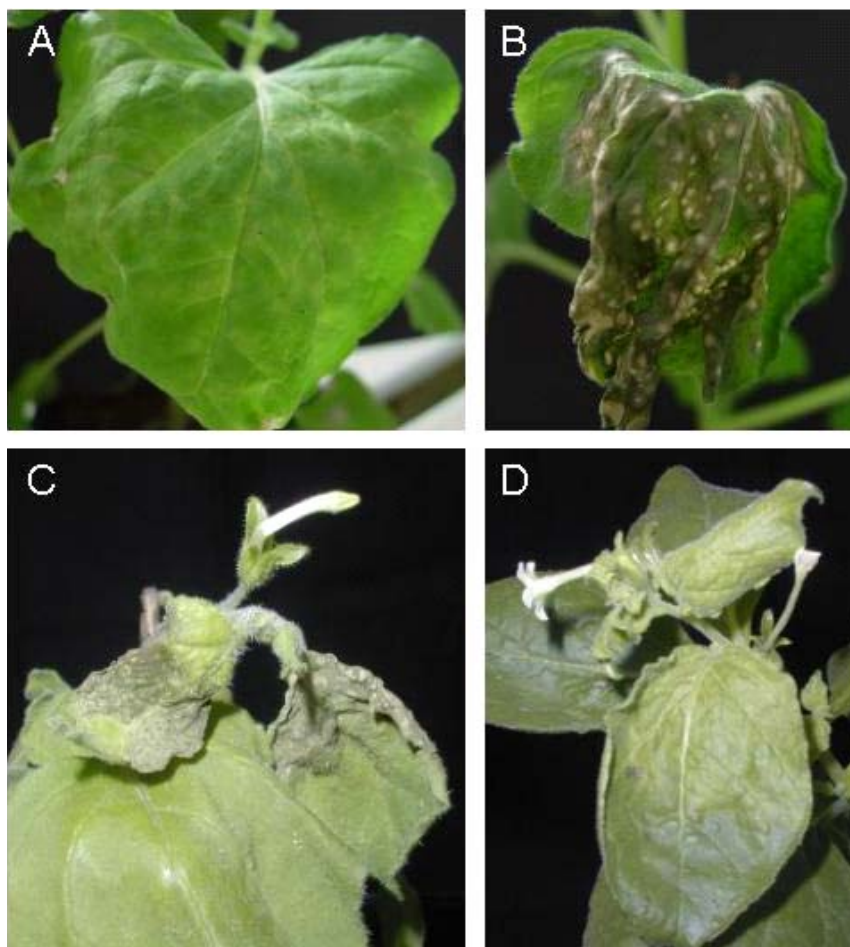


Figura 3 – Sintomas observados em plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com tospovírus. A) Lesões cloróticas em folhas inoculadas de plantas não-transformadas. B) Resposta de hipersensibilidade em folha de planta transformada com *Sw-5*. C) Necrose sistêmica em planta transformada com *Sw-5*. D) Clorose e deformação foliar, sintomas sistêmicos induzidos por tospovírus em plantas não-transformadas.

DISCUSSÃO

O gene *Sw-5* é funcional em *Nicotiana benthamiana*. Esta funcionalidade é evidenciada por dois aspectos que diferenciam as plantas transformadas das não-transformadas: presença de lesões locais necróticas nas folhas inoculadas e capacidade de contenção do vírus no sítio primário de infecção. Lesões necróticas no sítio de infecção, visualizadas pouco tempo após a inoculação, caracterizam a resposta de hipersensibilidade (HR), um fenômeno que envolve o reconhecimento da presença do patógeno e a ativação de vias de transdução de sinais que conduzem às respostas de defesa (Staskawicz et al., 1995, Staskawicz, 2001).

A funcionalidade da construção pGPP63 em *N. benthamiana*, em acordo com resultados obtidos em tabaco (Oliveira et al., 2001; Yamazaki, 2001), demonstra que a ORF *Sw-5* utilizada na transformação contém toda a informação necessária à codificação de uma proteína capaz de ativar o processo de defesa. Assim, as seqüências de DNA adjacentes à ORF presentes no clone cosmídeo TC134-8 (inseto de aproximadamente 20 Kb), utilizado anteriormente na transformação de tomate, tabaco e berinjela (Brommonschenkel et al., 1998; 2000; Costa et al., 1999; Picoli et al., 1999; Picoli, 2000), não são requeridas para o desencadeamento da resposta de hipersensibilidade e resistência a tospovírus. Quanto às regiões regulatórias, há que se ressaltar que a construção apresenta um segmento da região 3' não-traduzida do próprio gene *Sw-5*, o qual contém um provável sinal de poliadenilação (Lima, 2001). Esta região pode ter papel na estabilidade do RNA mensageiro, determinando o seu tempo de vida média e afetando os níveis de proteína sintetizada. A ausência desta região ou a substituição desta por regiões reguladoras de outros genes, podem alterar os níveis de mRNA na célula e, por conseqüência, a resistência. Embora os níveis de mRNA de *Sw-5* na célula sejam normalmente muito baixos (Brommonschenkel et al., 2000), fato que pode ser devido à baixa taxa de transcrição ou a uma vida média curta do mRNA, este sistema, aparentemente, é sensível ao nível de proteína presente (Lau, 2001). Sendo assim, fatores que levem a alterações nos níveis da proteína (número de cópias do transgene, elementos cis-regulatórios localizados à montante ou à jusante da ORF) podem modificar os níveis de resistência. A ausência das regiões cis-regulatórias do próprio gene foi apontada como um dos possíveis motivos pelos quais uma construção contendo o gene *Y-I*, um homólogo do gene *N*, foi capaz de ativar a resposta de hipersensibilidade, mas incapaz de conter a infecção sistêmica por PVY (Vidal et al.,

2002). Para o próprio gene *Sw-5*, por análise de seqüência do loco, verifica-se a presença de regiões MAR (*Matrix Attachment Region*) que podem, por interação com proteínas, tornar o promotor mais acessível à maquinaria de transcrição (Spasova et al., 2001), o que justificaria os níveis de resistência mais altos observados nas plantas transformadas com construções contendo esta região.

A funcionalidade de *Sw-5* em *N. benthamiana*, indica que as vias de sinalização e os mecanismos de defesa ativados pela proteína de resistência estão presentes nesta planta. Além do tomateiro, planta da qual o gene foi clonado, esta é a terceira espécie na qual se demonstra a conservação das vias de defesa ativadas por *Sw-5*. As outras duas espécies nas quais *Sw-5* foi funcional, tabaco e berinjela (Brommonschenkel et al., 1998; Picoli, 2000; Spasova et al., 2001), também pertencem à família Solanaceae. Esta conservação pode ser restrita a esta família, uma vez que plantas de alface (família Asteraceae) transformadas com este gene são suscetíveis a tospovírus (Karasawa, 2001; Yamazaki, 2001). A conservação das vias de defesa dentro da família Solanaceae está bem demonstrada para outros genes de resistência, os quais foram transferidos para outras espécies por meio de transformação estável: gene *N* de tabaco para tomate (Whitham et al., 1996), *Pto* de tomate para *N. benthamiana* e tabaco (Rommens et al., 1995; Thilmony et al., 1995), *Cf-9* de tomate para tabaco e batata (Hammond-Kosack et al., 1998) e *Bs2* de pimentão para tomate (Tai et al., 1999). Técnicas de expressão transiente que são mais rápidas e, portanto, facilitam a análise em um maior número de plantas, demonstraram que os genes *Bs2* de pimentão e *Cf-4* e *Cf-9* de tomateiro são capazes de induzir resposta de hipersensibilidade em diversas solanáceas (Tai et al., 1999; Van der Hoorn et al., 2000).

A conservação dos componentes das vias de defesa ativadas por um gene de resistência, permite supor que existam homólogos deste gene em diferentes espécies de plantas, mesmo que, por meio de modificações ao longo da evolução, estes tenham adquirido outras especificidades e sejam incapazes de ativar o processo de defesa para um mesmo patógeno. A presença de homólogos dentro da família Solanaceae (tomate, tabaco, batata e berinjela) foi demonstrada para o gene *Bs2* (da mesma classe que *Sw-5*), originário da pimenta (*Capsicum chacoense*) e capaz de desencadear HR nestas espécies (Tai et al., 1999). A presença de homólogos de *Sw-5* foi demonstrada em *Capsicum* spp. (Jahn et al., 2000); no entanto, estes não conferem resistência a tospovírus. A análise da evolução de genes de resistência dentro da família Solanaceae, mostra que a especificidade de reconhecimento do patógeno pode estar evoluindo rapidamente,

enquanto mantém-se conservada a capacidade de disparar as respostas de defesa. Esta hipótese é baseada na observação de que genes homólogos, ocupando a mesma posição no genoma, podem conferir resistência a patógenos diferentes (Grube et al., 2000). Em diferentes espécies de tomateiro, genes homólogos podem ser amplificados por meio de PCR com oligonucleotídeos baseados na seqüência de *Sw-5* (Lima, 2001). Utilizando-se oligonucleotídeos que pareiam na região 5' de *Sw-5*, observa-se a amplificação de fragmentos de tamanho esperado em tabaco, *N. benthamiana*, berinjela e batata (dados não-mostrados). No entanto, à exceção de batata, cuja quantidade de produto amplificado é similar ao de tomateiro, para as demais espécies a amplificação é bem mais fraca, supostamente porque o pareamento dos oligonucleotídeos não é tão eficiente devido a divergências nas seqüências. A amplificação observada em batata pode ser explicada pela estreita relação desta espécie com o tomateiro, a qual é evidenciada pela sintonia de muitos genes de resistência (Pan et al., 2000).

A comparação entre o espectro da resistência conferida por *Sw-5* em *N. benthamiana* com o observado em tomate, berinjela e tabaco, indica haver uma equivalência nestes sistemas. O isolado V1-3, causador de necrose sistêmica em *N. benthamiana*, induz necrose sistêmica em tomateiro heterozigoto para o gene *Sw-5* e também causa infecção sistêmica em tabaco transgênico. Além disso, as lesões observadas nas folhas inoculadas com V1-3, que se distinguem da HR bem definida observada para os outros isolados, podem ser comparadas às lesões necróticas com anéis concêntricos observadas em berinjela (Lima et al., 2000). Assim, os resultados em sistemas heterólogos sugerem haver um deslocamento da resistência para níveis mais baixos, em que a tendência de um isolado em quebrar a resistência conferida por *Sw-5* torna-se mais pronunciada. Conforme discutido anteriormente, um dos fatores que pode afetar a resistência é o nível de expressão do transgene, em que contribuem a posição de inserção deste no genoma e os elementos cis-regulatórios. O aumento da resistência, verificado em uma progênie de tabaco com duas inserções de *Sw-5* sob controle do promotor 35S, reforça a hipótese da relação entre nível de expressão e resistência (Yamazaki, 2001). Ainda quanto ao hospedeiro, a menor funcionalidade da proteína em sistema heterólogo e respostas de defesa menos eficientes devem ser consideradas. Por outro lado, considerando-se o patógeno, é possível que este consiga infectar mais rapidamente determinados hospedeiros. Se assim for, mesmo que as respostas de defesa ativadas em todos os hospedeiros ocorressem ao mesmo tempo e com a mesma intensidade, aqueles em que a infecção ocorresse de forma mais rápida poderiam ser

incapazes de conter o patógeno no sítio de infecção, resultando em necrose sistêmica na planta pela ativação de HR nos tecidos onde o vírus se propaga.

Estudos realizados em tabaco (Lau, 2001; Oliveira et al., 2001; Yamazaki, 2001), em que plantas transformadas foram completamente suscetíveis a determinados isolados de tospovírus, não sendo observada HR, reforçam a hipótese de que podem existir deficiências na funcionalidade da proteína Sw-5 em sistemas heterólogos. Esses resultados podem ser explicados pela menor eficácia da interação da proteína Sw-5 com os demais componentes das vias de transdução de sinais, que ativam as respostas de defesa nesses sistemas. Esta hipótese é corroborada pela observação de que para alguns genes de resistência, dependendo da planta em que são expressos, diferentes quantidades da molécula elicitora são necessárias para o desencadeamento de HR. O gene *Cf-9*, por exemplo, é capaz de desencadear HR em *Brassica napus*, mas somente se quantidades do peptídeo elicitor *Avr9*, muito superiores às utilizadas em tomate (de onde o gene é originário), forem infiltradas nos tecidos (Hennin et al., 2001).

Em resumo, os resultados obtidos para *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene *Sw-5*, indicam que a ORF deste gene contém toda informação necessária para codificar uma proteína capaz de desencadear o processo de defesa a tospovírus. Além disso, *N. benthamiana*, assim como outros membros da família Solanaceae, contém os componentes das vias de transdução de sinais e elementos de resposta de defesa a tospovírus ativados pela proteína Sw-5. A comparação do espectro da resistência observado em *N. benthamiana* com o observado para outras solanáceas, corrobora a hipótese de que polimorfismo genético nos componentes das vias de transdução de sinais pode resultar em diferentes níveis de resistência, mesmo no caso de genes de efeito principal.

LITERATURA CITADA

BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B., DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v.276, p.726-733, 1997.

BENDAHMANE, A., KANYUKA, K., BAULCOMBE, D., C. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. **Plant Cell**, v. 11, p.781-791, 1999.

- 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**, v.89, p.823-830, 1999.
- BOITEUX, L.S., GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, v.71, p.151-154, 1993.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., TANKSLEY, S.D., FRARY, A., FRARY, A., OTONI, W.C., CHEAVEGATTI, A. Positional cloning, molecular characterization and heterologous expression of the tospovirus resistance gene *Sw-5*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998. Edinburgh, Scotland. **Proceedings...** Edinburgh, 1998, v.3. p.54.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., FRARY, A., 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**, v.13, p.1130-1138, 2000.
- COSTA, M.G.C., LAU, D., GUIMARÃES, L.M., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C. Incorporação do gene *Sw-5* no cultivar de tomateiro industrial 'IPA-6' por meio de transformação genética e análise da resistência à infecção por *Tospovirus*. In: 45º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 1999, Gramado. **Resumos...**Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999, p.716.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.
- FULTON, T.M., CHUNWONGSE, J., TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.13, p.207-209, 1995.
- GERMAN, T.L., ULLMAN, D.E., MOYER, J.W. *Tospoviruses*: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.315-348, 1992.
- GRANT, M.R., GODIARD, L., STRAUBE, E., ASHFIELD, T., LEWALD, J., SATTLER, A., INNES, R.W., DANGL, J.L. Structure of the Arabidopsis *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. **Science**, v. 269, p.843-84, 1995.
- GRUBE, R.C., RADWANSKI, E.R., JAHN, M. Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae. **Genetics**, v.155, p.873-887, 2000.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., TANG, S., HARRISON, K., JONES, J.D.G. The tomato *Cf-9* disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product Avr9. **Plant Cell**, v.10, p.1251-1266, 1998.

- HENNIN, C., HÖFTE, M., DIEDERICHSEN, E. Functional expression of *Cf-9* and *Avr9* genes in *Brassica napus* induces enhanced resistance to *Leptosphaeria maculans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.1075-1085, 2001.
- HUTCHESON, S.W. Current concepts of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.59-90, 1998.
- INNES, R.W. Genetic dissection of R gene signal transduction pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.299-304, 1998.
- JAHN, M. K., PARAN, I., HOFFMAN, K., RADWANSKI, E. R., LIVINGSTONE K. D. GRUBE, R.C., AFTERGOOT, E., LAPIDOT, M., MOYER, J. Genetic mapping of the Tsw locus for resistance to the *Tospovirus Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum* spp. and its relationship to the *Sw-5* gene for resistance to the same pathogen in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.673-682, 2000.
- KARASAWA, M., BROMMONSCHENCKEL, S.H., YAMAZAKI, E., OTONI, W.C., LAU, D., LIMA, G.S.A. Transformação de alface (*Lactuca sativa* L.) com o gene *Sw-5* que confere resistência a tospovírus em tomateiro. In: 46º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2000, Águas de Lindóia. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2000, p.239-240.
- KARASAWA, M. **Transformação de alface com o gene *Sw5* originário de tomateiro e avaliação da resistência das plantas transgênicas a tospovírus.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 40p. Dissertação (Tese de Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- KUROZAWA, C., PAVAN, M.A. Doenças das Solanáceas. In: KIMATI, H., AMORIN, L. BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (ed.) **Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas.** São Paulo: Agronômica Ceres. v.2. p. 665-675. 1997.
- LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., CARVALHO, E.C.S., LIMA, G.S.A., ZERBINI, F.M. Analysis of the *Sw-5*-mediated resistance response to *Tospovirus* species. In: X ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 1999, Curitiba. **Resumos...**São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 1999, p.154-155.
- LAU, D. **Análise de fatores que influenciam a resistência a tospovírus conferida pelo gene *Sw-5* em tomateiro e tabaco.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 84p. Dissertação (Tese de Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LIMA G.S.A., PICOLI, E.A.T., LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C., ZERBINI, F.M. Signal transduction pathways mediated by the *Sw-5* are conserved in eggplant. In: 11th National Meeting of Virology, 2000, São Lourenço. **Resumos...**São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 2000, p.191-192.

- LIMA, G.S.A. **Resistência a tospovírus, clonagem e caracterização molecular de alelos do loco *Sw-5* em espécies de *Lycopersicon***. Viçosa, MG: UFV, 2001. 91p. Dissertação (Tese de Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LIMA, G.S.A, LAU, D, PICOLI, E.A.T., ASSUNÇÃO, I.P., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C. Reação de genótipos de berinjela a quatro espécies de tospovírus **Summa Phytopathologica**, v.28, p.242-247, 2002.
- LOPES, C.A., SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA–SPI, 1994. 67p.
- MARTIN, G.B., BOGDANOVE, A.J., SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p.23-61, 2003.
- MILLIGAN, S.B., BODEAU, J., YAGHOUBI, J., KALOSHIAN, I., ZABEL, P., Williamson, V.M. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **Plant Cell**, v.10, p.1307-1319, 1998.
- OLIVEIRA, J.C., LAU, D., YAMAZAKI, E., LIMA, G.S.A., BROMMONSCHENKEL, S.H. A resistência conferida pelo gene *Sw-5* em sistema heterólogo é influenciada pelo isolado viral e número de cópias do transgene. In: XXXIV CONGRESSO NACIONAL DE FITOPATOLOGIA, 2001, São Pedro. **Resumos...**Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001, p.528.
- ORI, N., ESHED, Y., PARAN, I., PRESTING, G., AVIV, D., TANKSLEY, S., ZAMIR, D., FLUHR, R. The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. **Plant Cell**, v.9, p.521-532, 1997.
- PAN, Q., LIU, Y-S, BUDAI-HADRIAN, O., SELA, M., CARMEL-GOREN, L., ZAMIR D., FLUHR, R. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and arabidopsis. **Genetics**, v.155, p.309-322, 2000.
- PETERS, D., WIJKAMP, I., VAN DE WETWRING, F., GOLDBACH, R. Vector relations in the transmission and epidemiology of tospoviruses. **Acta Horticulturae**, v.431, p.29-43, 1996.
- PICOLI, E.A.T., LIMA, G.S.A., LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C., ZERBINI, F.M. Heterologous expression of the *Sw-5* gene in eggplant (*Solanum melongena* L.) confers resistance to *tospovirus* infection. In: X ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 1999, Curitiba. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 1999, p.155.
- PICOLI, E.A.T. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embú) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa, MG: UFV, 2000. 141p. Dissertação (Tese de Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.

- ROMMENS, C.M.T., SALMERON, J.M., OLDROYD, G.E.D., STASKAWICZ, B.J. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. **Plant Cell**, v.7, p.1537-1544, 1995.
- RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A., STEINER, H., HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.
- SALMERON, J.M., OLDROYD, G.E.D., ROMMENS, C.M.T., SCOFIELD, S.R., KIM, H.-S., LAVELLE, D.T., DAHLBECK, D., STASKAWICZ, B.J. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. **Cell**, v.86, p.123-133, 1996.
- SPASSOVA, M.I., PRINS, T.W., FOLKERTSMA, R.T., KLEIN-LANKORST, R.M., HILLE, J., GOLDBACH, R.W., PRINS M. The tomato gene *Sw-5* 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**, v.7, p.151-161, 2001.
- SOMSSICH, I.E., HAHLBROCH, K. Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, v.3, p.86-90, 1998.
- STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J. ELLIS, J.G., JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v.268, p.661-667, 1995.
- STASKAWICZ, B.J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, v.125, p.73-76, 2001.
- 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**, v.59, p.9-17, 1992.
- TAI, T.H., DAHLBECK, D., CLARK, E.T., GAJIWALA, P., PASION, P., WHALEN, M.C., STAHL, R.E., STASKAWICZ, B.J. Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.96, p.14153-14158, 1999.
- THILMONY, R.L., CHEN, Z., BRESSAN, R.A., MARTIN, G.B. Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing *avrPto*. **Plant Cell**, v.7, p.1529-1536, 1995.
- VAN DER HOORN, R.A.L., LAURENT, F., ROTH, R., DE WIT, J.G.M. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of *Avr9/Cf-9*-induced and *Avr4/Cf-4*-induced necrosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.439-446, 2000.
- VIDAL, S., CABRERA, H., ANDERSSON, R.A., FREDRIKSSON, A., VALKONEN, J.P.T. Potato gene *Y-1* is an *N* gene homolog that confers cell death upon infection with *Potato virus Y*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.717-727, 2002.

YAMAZAKI, E. **Resistência de tabaco e alface transformados com o gene Sw-5, sob o controle do promotor 35S, a três espécies de tospovírus.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 49p. Dissertação (Tese de Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

WHITHAM, S., McCORMICK, S., BAKER, B. The *N* gene of tobacco confers resistance to *Tobacco mosaic virus* in transgenic tomato. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.93, p.8776-8781, 1996.

CAPÍTULO 2

PROTEÍNA NSs DE TOSPOVÍRUS INDUZ NECROSE EM SOLANÁCEAS INDEPENDENTEMENTE DA PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA *Sw-5*

Douglas Lau¹, Elene Yamazaki Lau¹, Sofia Maki Endo¹, Sérgio Hermínio Brommonschenkel¹, Francisco Murilo Zerbini Jr.¹

¹Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG; Brasil. (Autor para correspondência: shbromo@ufv.br).

RESUMO

O gênero *Tospovirus* é o único da família Bunyaviridae que contém espécies capazes de infectar plantas. Os membros deste gênero apresentam envelope lipídico no interior do qual, além da polimerase viral, encontram-se três diferentes RNAs (L, M e S) envoltos por um nucleocapsídeo. O RNA L contém uma única ORF cujo produto é a polimerase viral. O RNA M codifica a proteína NSm (responsável pelo movimento do vírus na planta) e as glicoproteínas G1/G2 (constituintes do envelope viral). O RNA S é responsável pela produção da proteína não-estrutural NSs (supressora de silenciamento gênico) e da proteína N (nucleocapsídeo). O gene *Sw-5*, originário do tomateiro, confere resistência a tospovírus em várias espécies da família Solanaceae. Quando inoculadas com tospovírus, plantas expressando este gene exibem reações necróticas no sítio de infecção e impedem a infecção sistêmica do vírus. A proteína codificada por *Sw-5* apresenta os domínios NBS (*nucleotide binding site*) e LRR (*leucine rich repeats*). O fenótipo da resistência e a estrutura da proteína *Sw-5*, sugerem que a resistência depende do reconhecimento do patógeno e desencadeamento de respostas de defesa. O elicitor que desencadeia esta resposta é desconhecido. Neste trabalho, três genes de tospovírus (*N*, *NSm* e *NSs*) foram expressos em plantas de *N. benthamiana* transformadas e não-transformadas com *Sw-5*, por meio do vetor viral PVX. Os genes foram expressos isoladamente ou em combinações (infecções mistas). Não houve diferenças nos sintomas observados em plantas com e sem *Sw-5*. Os clones de PVX::*N* e PVX::*NSm*, inoculados separadamente ou em infecções mistas, causaram sintomas similares aos de PVX selvagem. O clone PVX::*NSs* causou necrose dos tecidos, sendo esta mais severa quando o clone foi inoculado isoladamente. Necrose semelhante foi observada em infecções mistas entre PVX selvagem e tospovírus. PVX::*NSs* também causou sintomas severos em outras espécies da família Solanaceae, no entanto, sua capacidade de causar infecção sistêmica nas plantas avaliadas não diferiu do PVX selvagem.

Palavras-chave: resposta de hipersensibilidade, gene de avirulência, silenciamento gênico.

INTRODUÇÃO

O gênero *Tospovirus* é o único membro da família Bunyaviridae que contém espécies capazes de infectar plantas (German et al., 1992). A expansão geográfica da distribuição dos tospovírus e o aumento do número de espécies descritas neste gênero, indicam que sua história evolutiva é recente e, provavelmente, originado de um vírus animal que adquiriu a capacidade de infectar plantas (Goldbach e Peters, 1994). Esta adaptação pode ter relação com a aquisição do gene que codifica para a proteína responsável pela movimentação do vírus na planta (Goldbach e Peters, 1994; Van Poelwijk et al., 1996). Estes vírus infectam ampla gama de hospedeiros em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (German et al., 1992; Peters et al., 1996), sendo transmitidos por diferentes espécies de tripes (família Thripinae) (German et al., 1992; Peters et al., 1996).

Os tospovírus apresentam partículas esféricas ou quase esféricas, com tamanho variando entre 80 e 120 nm. As partículas são envoltas por envelope lipídico contendo glicoproteínas (German et al., 1992). No interior da partícula, além da polimerase viral, estão presentes três RNAs designados pelo seu tamanho relativo: L, M e S. O RNA L contém uma ORF cujo produto é a polimerase viral (De Haan et al., 1991). O RNA M contém duas ORFs responsáveis pela produção da proteína não-estrutural NSm e das glicoproteínas G1/G2 (Kormelink et al., 1992). O RNA S é responsável pela produção da proteína não estrutural NSs e da proteína N (De Haan et al., 1990).

A proteína NSm está envolvida no movimento célula-a-célula do vírus na planta (Kormelink et al., 1994). As proteínas G1 e G2 estão envolvidas na formação do envelope viral e na transmissão do vírus por tripes (Kikkert et al., 1999; Resende et al., 1991). A proteína N é responsável pela encapsidação dos RNAs virais e regulação do ciclo viral, alternando as fases de replicação e transcrição (Van Poelwijk et al., 1996). A proteína NSs é capaz de suprimir silenciamento gênico (Takeda et al., 2002), sendo uma proteína de contra-resposta que os vírus possuem para desativar mecanismos de defesa das plantas.

Entre as espécies de tospovírus descritas, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), são capazes de infectar diversas espécies da família Solanaceae, promovendo a doença conhecida como “vira-cabeça” (Lopes e Santos, 1994; Kurozawa e Pavan, 1997; Bezerra et al., 1999, Lima et al., 2002). A sintomatologia causada por estas espécies de tospovírus é muito variada dependendo do isolado viral, da planta hospedeira, da idade da planta e das condições climáticas (German et al., 1992; Lopes e Santos, 1994; Pozzer et al., 1996). De modo geral, os sintomas foliares se iniciam com a formação de lesões cloróticas e, ou, necróticas, muitas vezes em anéis concêntricos. Nos pontos de infecção sistêmica, pode-se observar clorose e necrose das nervuras. Nas hastes, os sintomas costumam ser severos, com necrose que pode levar à morte da planta. Algumas espécies de tospovírus produzem sintomas mais severos. Por exemplo, CSNV induz predominantemente necrose em diversos tecidos (Bezerra et al., 1999; Lau, 2001).

Os sintomas observados em plantas infectadas são resultados da interferência em processos celulares. O acúmulo generalizado de proteínas virais pode comprometer o funcionamento normal da célula e afetar a fisiologia de tecidos e órgãos. Os sintomas podem também ser reflexo da ação de proteínas específicas. Por exemplo, a expressão isolada de proteínas de movimento de vírus é capaz de causar desequilíbrios fisiológicos mesmo na ausência das demais proteínas virais (Olesinski et al., 1995). Recentemente, tem sido demonstrado que um grupo de proteínas virais que apresentam em comum a capacidade de suprimir o silenciamento gênico, são importantes fatores de patogenicidade, alterando os sintomas dos vírus que as expressam (Brigneti et al., 1998).

Os determinantes virais responsáveis pelos sintomas induzidos por tospovírus não são conhecidos. Estes vírus promovem uma série de alterações no citoplasma das células devido ao acúmulo de suas proteínas e utilização das organelas citoplasmáticas, principalmente Golgi e retículo endoplasmático. A proteína N acumula-se normalmente na forma de agregados ou em estruturas difusas, denominadas viroplasmas. A proteína NSs está presente em inclusões citoplasmáticas constituídas por estruturas fibrilares (Pozzer et al., 1996; Lawson et al., 1996). A proteína NSm encontra-se associada a agregados de nucleocapsídeo ou formando túbulos através dos plasmodesmas (Kormelink et al., 1994; Storms et al., 1995). Provavelmente, NSm executa ou auxilia o movimento de nucleocapsídeos através dos plasmodesmas (Kormelink et al., 1994;

Storms et al., 1995), podendo, para isso, recrutar a maquinaria de transporte celular (Soellick et al., 2000). A expressão da proteína NSm pode causar alterações fisiológicas, o que é constatado pela redução do crescimento em plantas transformadas com esta proteína (Van Poelwijk et al., 1996). As glicoproteínas, G1 e G2, estão associadas ao sistema de endomembranas da célula (retículo endoplasmático e complexo de Golgi), sendo necessárias à formação das partículas envelopadas (Kikkert et al., 1999). Na ausência destas proteínas, apenas agregados de nucleocapsídeos podem ser observados no citoplasma das células infectadas, sendo possível que estas alterações no ciclo viral tenham relação com os sintomas severos observados em mutantes morfológico-defectivos (Resende et al., 1991). A proteína NSs pode estar relacionada à severidade dos sintomas causados por tospovírus, uma vez que isolados mais agressivos acumulam maior quantidade desta proteína no citoplasma da planta hospedeira (Kormelink et al., 1991).

Muitos sintomas necróticos locais e sistêmicos produzidos por vírus, têm sua origem na relação específica entre proteínas virais e proteínas da planta, as quais desencadeiam respostas de defesa contra os vírus (Culver et al., 1991). A necrose localizada no sítio de infecção, muitas vezes denominada de resposta de hipersensibilidade (HR), corresponde a um conjunto de células em que a morte celular programada foi ativada. Muitas vezes, os mecanismos de defesa ativados durante este processo não são suficientes para a contenção do patógeno, resultando em infecção generalizada dos tecidos da planta conhecida como necrose sistêmica (Weintraub et al., 1963). A especificidade do desencadeamento da resposta de hipersensibilidade foi demonstrada, inicialmente, por estudos genéticos. Segundo a teoria gene-a-gene, para cada gene de avirulência do patógeno existe um gene de resistência correspondente na planta (Flor, 1971). As proteínas codificadas pelos genes de resistência apresentam estrutura relacionada às funções de reconhecimento e ativação das respostas de defesa (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Martin et al., 2003). Contrariamente, os genes de avirulência correspondem a um entre os genes do patógeno, cuja proteína, quando expressa em planta, desencadeia a resposta de hipersensibilidade, não havendo, portanto, qualquer conservação estrutural entre as proteínas codificadas. Em tese, qualquer gene do patógeno pode vir a ser um gene de avirulência como demonstrado para os tobamovírus (Culver et al., 1991; Berzal-Herranz et al., 1995; De La Cruz et al., 1997; Weber et al., 1993; Weber e Pfitzner, 1998; Padgett et al., 1997; Abbink et al., 1998; Erickson et al., 1999).

O gene *Sw-5* confere resistência a tospovírus em diversos membros da família Solanaceae. Plantas com *Sw-5* produzem reações locais necróticas quando inoculadas com tospovírus (Brommonschenkel et al., 1998; Picoli et al., 1999; Brommonschenkel et al., 2000; Capítulo 1), e, assim como ocorre com outros genes de resistência em certas situações, as respostas de defesa desencadeadas por *Sw-5* são insuficientes para conter a infecção viral, resultando em necrose sistêmica dos tecidos (Lau, 2001). O gene *Sw-5* codifica uma proteína de 1.246 aminoácidos contendo domínios NBS (*nucleotide binding site*) e LRR (*leucine rich repeats*) (Brommonschenkel et al., 2000), semelhante, portanto, a outras proteínas envolvidas na resposta de resistência a fitopatógenos (Martin et al., 2003). O fenótipo da resistência e a estrutura da proteína *Sw-5*, sugerem que esta atue reconhecendo algum componente viral e desencadeando respostas ativas de defesa (reação de hipersensibilidade). No entanto, não se conhece que elemento dos tospovírus leva a proteína *Sw-5* a desencadear este processo. A fim de identificar este elemento, três genes de tospovírus (*N*, *NSm* e *NSs*) foram transferidos para o vetor viral PVX e expressos em plantas de *Nicotiana benthamiana* transformadas com *Sw-5*. Os sintomas, produzidos pelos clones de PVX contendo estes genes, foram semelhantes em plantas com ou sem *Sw-5*, não havendo qualquer tipo de restrição à infecção sistêmica dos mesmos. Independentemente da presença de *Sw-5*, clones com o gene *NSs* induziram severa necrose em plantas de *N. benthamiana* bem como em outras solanáceas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, isolados e inoculação de tospovírus

A expressão transitória dos genes de tospovírus foi conduzida em plantas de *Nicotiana benthamiana* da linhagem B5-5, que contém o gene *Sw-5* em homozigose (Capítulo 1), e em plantas não-transformadas da mesma espécie.

Os isolados de tospovírus V1-3 (TCSV), Cb e AL (GRSV), utilizados neste trabalho, são originários do Brasil e fazem parte da coleção do Laboratório de Genética da Interação-Planta Patógeno (BIOAGRO/UFV), sendo sua identificação baseada no sequenciamento do gene *N* (nucleocapsídeo). O número de acesso da seqüência do nucleocapsídeo dos isolados é dado a seguir: V1-3 (AF282982), Cb (AF251271) e AL (AF513219). A reação a estes isolados em plantas expressando o gene *Sw-5* foi descrita

por Lau (2001) e no Capítulo 1 desta dissertação. Os isolados foram inoculados via extrato vegetal tamponado. O inóculo original, mantido a -80°C , foi previamente multiplicado em *N. tabacum* ‘Havana 425’. Folhas infectadas foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,01M e carborundum 600 mesh. O extrato foi esfregado sobre as folhas de *N. benthamiana* com auxílio de gaze.

Clonagem dos genes *N*, *NSm* e *NSs* de tospovírus no vetor pGR106

Os genes *N*, *NSm* e *NSs*, do isolado AL de tospovírus, foram amplificados via RT-PCR. Inicialmente, RNA obtido a partir de partículas virais (Lane, 1992) ou RNA total (RNeasy, Qiagen) foram extraídos de plantas de *N. tabacum* “Havana 425” com infecção sistêmica. A integridade, pureza e concentração do RNA purificado, foram determinadas por meio de eletroforese em gel desnaturante contendo ácido 3-[N-morfolina]propano-sulfônico (MOPS) 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, agarose 1,2% (p/v), brometo de etídeo a 100 mg/l e formaldeído 221,4 mM.

O RNA total e o RNA viral purificado foram utilizados para a síntese do cDNA por meio de transcrição reversa (Sambrook et al., 1989). Os oligonucleotídeos utilizados nesta etapa do trabalho, bem como na reação de PCR subsequente, estão listados na Tabela 1. O gene *N* foi amplificado com os oligonucleotídeos NGRSVR (utilizado para síntese de cDNA) e NGRSVF. O gene *NSm* foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos NSMGRR (utilizado para síntese de cDNA) e NSMGRF. Para o gene *NSs*, utilizou-se o oligonucleotídeo BR60 para síntese de cDNA e o par NSSFP/NSSR na reação de PCR. Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o kit “SuperScript First Strand Synthesis” (Invitrogen).

A reação de PCR foi executada em volume de 50 μl , contendo 2 a 3 μl de cDNA, 10 μl do tampão de reação 5X (Tampão B), 4 μl da mistura de deoxinucleotídeos (0,01 M), 1 μl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 μM), 1 μl da enzima Elongase (Gibco-BRL) (2 a 5 unidades) e água destilada estéril suficiente para o volume final de 50 μl . Após desnaturação inicial a 94°C por 3 min, a amplificação constituiu de 35 ciclos de desnaturação por 30 s a 94°C , anelamento por 1 min a 50°C e extensão por 2 min a 68°C . Após os 35 ciclos foi realizada uma extensão final a 68°C por 5 min. O

produto da reação foi visualizado sob luz ultravioleta, após corrida eletroforética a 90V, por duas horas, em gel de agarose 1% em TAE 1X contendo brometo de etídeo.

Tabela 1 – Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes *N*, *N_{Sm}* e *N_{Ss}* de tospovírus.

Oligonucleotídeo	Seqüência
NSMGRF*	5'-CTG TTG GAT CCA ACA TGT TGA CAC TTT TCG GCA GC-3'
NSMGRR*	5'-GTA CTG CAG AGC TCT ATT ATA TTT CGT CCA CAA ACG-3'
NGRSVF*	5'-GAT CTA AGG ATC CAC CAT GTC TAA GGT CAA GCT C-3'
NGRSVR*	5'-CCC TGC AGA GCT CTC ATG CAA CAC CAG CAA TCT TG-3'
BR60**	5'-CAT GGA TCC TGC AGA GCA ATT GTG TCA-3
NSSR	5'-GCT GCA GTT TTA TTC TAG ATC ATA GCT GG-3'
NSSFP	5'-GAG CAC TGC AGC CAC AAT GTC ATC AGG TG-3'

* - seqüência dos oligonucleotídeos determinada a partir da seqüência fornecida pelo prof. Renato de Oliveira Resende, UnB, Brasília.

** - seqüência dos oligonucleotídeos conforme Eiras (1997).

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM-T (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 2 µl da reação de ligação foi utilizada para transformar *E. coli* estirpe DH5α (Sambrook et al., 1989). As células transformadas foram incubadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) com ampicilina (150 µg/ml), IPTG (1mM) e X-GAL (40 µg/ml), a 37°C por 12 h. Colônias contendo plasmídeos recombinantes foram identificadas pela coloração branca e transferidas para tubos contendo 3 ml de meio LB com ampicilina (150 µg/ml). As colônias foram incubadas a 37°C por 12 h, sob agitação constante (250 rpm). O DNA plasmidial foi isolado a partir dessas culturas, pelo método da lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Os plasmídeos foram clivados com as enzimas de restrição apropriadas para verificar a presença dos fragmentos clonados.

Os genes *N*, *N_{Sm}* e *N_{Ss}* do isolado AL, bem como os genes *N* e *N_{Sm}* dos isolados V1-3 e Cb, previamente clonados, (Lau, 2001), foram transferidos para o vetor pGR106 (cDNA do PVX clonado em vetor binário) ([http:// www. Jic.bbsrc.ac.uk/Sainsbury-Lab/ david-baulcombe/Services/vigsprotocol.htm](http://www.Jic.bbsrc.ac.uk/Sainsbury-Lab/david-baulcombe/Services/vigsprotocol.htm)). Os genes foram liberados com a enzima *Not* I, que flanqueia ambos os lados do sítio de clonagem

de pGEM-T, e ligados ao vetor pGR106 clivado com a mesma enzima (Figura 1). Os plasmídeos recombinantes foram transferidos por eletroporação para a estirpe GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. A identificação das colônias recombinantes foi realizada por PCR diretamente das colônias utilizando um par de oligonucleotídeos que pareiam próximo ao sítio múltiplo de clonagem do vetor pGR106 PVX-F (5'-AATCAATCACAGTGGTTGGCTTGC-3') e PVX-R (5'-AGTTGACCCTATGGGC TGTGTTG-3') (Torto et al., 2003). A determinação da orientação dos insertos foi realizada por meio de clivagem com enzimas específicas.

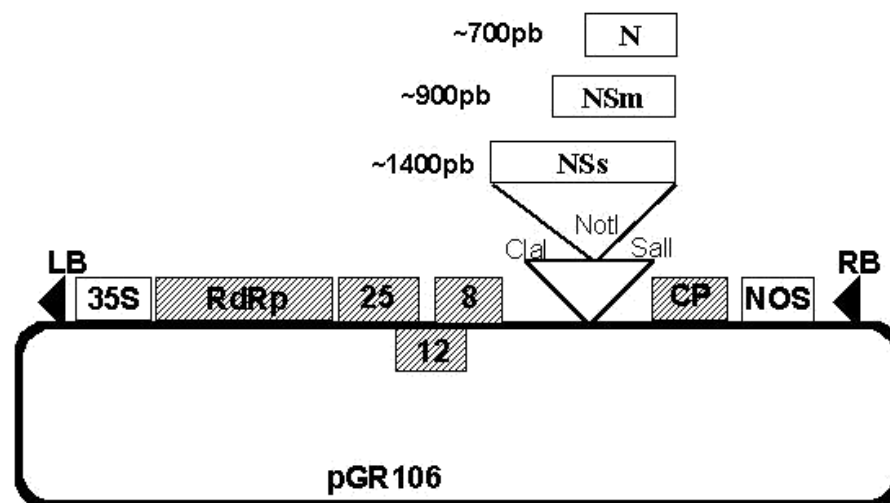


Figura 1 – Representação diagramática do vetor pGR106. LB – borda esquerda. 35S – promotor do RNA 35S do CaMV. Em hachuras, cDNA do PVX (RdRp - RNA polimerase-RNA dependente; 25, 12, 8 - *Triple Gene Block*; CP – capa protéica). NOS – terminador do gene *nos*. RB – borda direita.

Inoculação das plantas com os clones recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens*

As inoculações dos clones de *A. tumefaciens* contendo o vetor viral PVX e genes de tospovírus, foram realizadas pelo “método do palito”. Os clones da agrobactéria repicados em placas de Petri contendo meio LB, e os antibióticos canamicina (50 µg/ml) e tetraciclina (5µg/ml) foram mantidos a 28°C. Colônias bem desenvolvidas, obtidas após dois a três dias de incubação, foram introduzidas no pecíolo e ao longo da nervura principal das folhas inferiores com auxílio de um palito. Três plantas de cada genótipo (transformadas e não-transformadas) foram inoculadas com cada clone ou combinações destes. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação e

avaliadas quanto ao desenvolvimento de sintomas locais e sistêmicos até, 30 dias após a inoculação.

Confirmação da expressão transitória dos genes de tospovírus em *Nicotiana benthamiana*

A comprovação da expressão dos genes *N*, *NSm* e *NSs* de tospovírus, foi feita por meio de RT-PCR. O RNA total extraído de folhas exibindo sintomas de infecção sistêmica foi utilizado na síntese de cDNA, utilizando-se o oligonucleotídeo PVX-R (Torto et al., 2003). A PCR foi conduzida conforme descrito anteriormente, utilizando-se o par de oligonucleotídeos PVX-R e PVX-F.

Confirmação da expressão transitória da proteína N de tospovírus em *Nicotiana benthamiana*

A expressão da proteína do nucleocapsídeo de tospovírus em *Nicotiana benthamiana*, pelos clones recombinantes de PVX, foi verificada por meio de DAS-ELISA (Clark e Adams, 1977). Como controles positivos foram utilizadas plantas infectadas com os isolados dos quais os genes foram isolados. Os anti-soros e conjugados para três espécies de tospovírus (TSWV, TCSV e GRSV) foram cedidos pelo Dr. Antônio Carlos de Ávila (Embrapa Hortaliças, Brasília, DF). Os anti-soros foram diluídos em 1:1000 (v/v) em tampão de revestimento (Na_2CO_3 1,59 g/l, NaHCO_3 2,93 g/l, NaN_3 0,2 g/l, pH 9,6) e 100 μl dos anti-soros diluídos foram adicionados às cavidades de placas de poliestireno. Após incubação por 12 h a 4°C, as placas foram lavadas com tampão PBST (NaCl 8 g/l, K_2HPO_4 1,15 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, KCL 0,2 g/l, NaN_3 0,2 g/l, Tween 20 0,5 g/l, pH 7,4). Amostras de folhas de *N. benthamiana* apresentando sintomas de infecção viral, foram trituradas na presença de tampão de extração (Na_2SO_3 1,3 g/l, NaN_3 0,2 g, PVP 20 g/l, ovo-albumina 2 g/l, Tween-20 20 g/l, pH 7,4, em 1.000 ml de tampão PBST), na proporção 1:5 (p/v) e 100 μl de cada amostra foram adicionados às cavidades da placa. Os controles positivos para as três espécies e controles negativos (extrato de planta sadia e planta infectada com PVX selvagem), também foram acrescentados às placas. Após incubação por 12 h a 4°C, as placas foram lavadas em tampão PBST. Os conjugados, previamente diluídos em tampão ECI (PVP 20 g/l, albumina de soro bovino 2 g/l, NaN_3 0,2 g, em 1.000 ml de tampão PBST) (1:1.000), foram adicionados às placas (100 μl / cavidade), seguindo-se incubação por duas horas à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens, foram adicionados

100 µl do substrato p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml em tampão dietanolamina 97 ml/l, MgCl₂, 0,1 g/l, NaN₃ 0,2 g/l, pH 9,8). O substrato foi incubado por 30 minutos a 37°C. Após a reação enzimática, a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm.

Gama de hospedeiros de PVX::NSs

A gama de hospedeiros do PVX recombinante com o gene *NSs* do isolado AL de tospovírus, foi determinada inoculando-se plantas de *Gomphrena globosa*, *Chenopodium quinoa*, *Lycopersicon esculentum* ‘Rutgers’, *Capsicum annuum* ‘Ikeda’, *Nicotiana clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* ‘Havana 425’ e *N. tabacum* ‘Samsun’. Como controle, para fins de comparação, foram inoculadas plantas com PVX recombinante contendo o gene *NSs* na orientação anti-senso. Três plantas de cada espécie e para cada construção foram inoculadas via extrato vegetal tamponado (como descrito para tospovírus). Folhas de *N. benthamiana* expressando sintomas sistêmicos de infecção viral foram a fonte do inóculo. Todas as plantas inoculadas foram mantidas em condição de casa-de-vegetação e os sintomas observados diariamente até 20 dias após a inoculação.

Seqüenciamento dos genes *N*, *NSm* e *NSs* e análise comparativa do gene *NSs* do isolado AL

As seqüências de nucleotídeos dos genes *N* e *NSm* dos isolados V1-3 e Cb, foram determinadas previamente por Lau (2001). As seqüências de nucleotídeos dos genes *N*, *NSm* e *NSs* do isolado AL foram determinadas em seqüenciador automático Perkin-Elmer modelo ABI 3100, utilizando-se o kit “Big Dye v.3.0” (Amersham). As seqüências foram comparadas com as depositadas no GenBank e EMBL, utilizando-se os programas BLAST_n e T-BLAST_x (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>). A montagem da ORF do gene *NSs* foi realizada utilizando o programa DNAMAN 4.0 (Lynnon Biosoft). O alinhamento múltiplo das seqüências foi realizado no programa ClustalW versão 1.82. A árvore foi construída por análise de cluster empregando o método UPGMA (Sneath e Sokal, 1973).

RESULTADOS

Efeito da expressão isolada de genes de tospovírus em *Nicotiana benthamiana*

Independentemente da presença de *Sw-5*, o vetor viral PVX induziu em *N. benthamiana* sintomas de mosaico e leve deformação foliar nas folhas apicais (Figura 2A, B). Os genes *N* e *NSm* dos três isolados de tospovírus analisados (V1-3, Cb, AL), quando expressos isoladamente, não induziram alterações nos sintomas promovidos pelo PVX. A infecção mista por clones com cada um destes genes também não alterou os sintomas (Tabela 2). Apenas o gene *NSs* foi capaz de alterar os sintomas do PVX selvagem. Os sintomas provocados por este vírus recombinante foram severos e de natureza necrótica (Tabela 2; Figura 2C, D). Nas infecções mistas, em que o clone contendo *NSs* foi co-inoculado em combinações com outros clones, os sintomas foram mais brandos.

Sintomas mais severos, também necróticos, foram observados quando da inoculação conjunta de tospovírus e PVX selvagem. Estes sintomas são diferentes dos observados quando cada vírus foi inoculado separadamente, e semelhantes ao verificado para o PVX recombinante com a proteína *NSs* (Figura 3).

Os sintomas observados em *N. benthamiana* transformada com *Sw-5*, foram similares aos observados em plantas não transformadas tanto quando da expressão isolada dos genes de tospovírus, quanto nas infecções mistas com os clones expressando os diferentes genes. Sintomas diferentes entre estas plantas só foram constatados quando da inoculação com o isolado de tospovírus do qual os genes foram isolados. Nesta situação, a resposta de hipersensibilidade (para os isolados Cb e AL) ou a necrose sistêmica (para o isolado V1-3) foi evidente em plantas contendo *Sw-5*, enquanto que as plantas não transformadas exibiram reações locais cloróticas e sintomas sistêmicos também de natureza clorótica (Tabela 2).

Os transcritos correspondentes aos genes de tospovírus foram, detectados nos tecidos de *N. benthamiana* que apresentavam sintomas de infecção sistêmica pelos clones recombinantes de PVX. Por meio de RT-PCR, foi possível amplificar fragmentos de tamanho correspondente aos genes *N*, *NSm* e *NSs*. Estes foram detectados tanto em plantas transformadas com *Sw-5* (Figura 4A) quanto em plantas não transformadas (Figura 4B). Não houve restrição à presença de nenhum clone. Apenas nas infecções triplas (envolvendo os genes *N*, *NSm* e *NSs*) houve dificuldade na amplificação do gene

NSs. Este, contudo, pôde ser detectado pelo uso de oligonucleotídeos específicos para a seqüência deste gene (dados não-mostrados).

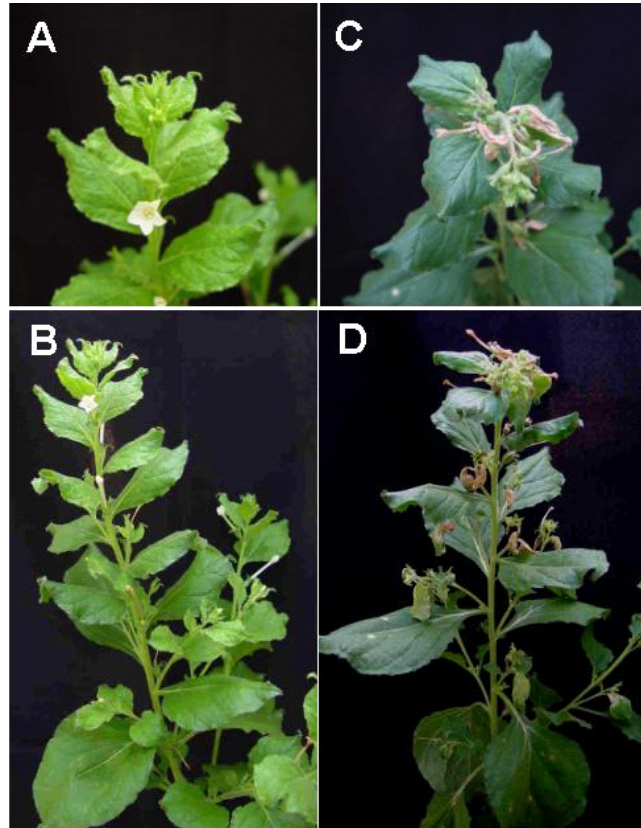


Figura 2 – Sintomas observados em plantas de *Nicotina benthamiana* inoculadas com clones de PVX. A) Mosaico em folhas apicais de planta inoculada com PVX selvagem (não-recombinante). B) Mosaico em brotações laterais da planta inoculada com PVX selvagem. C) Necrose induzida em folhas apicais de planta inoculada com PVX recombinante com o gene *NSs*. D) Necrose em brotações laterais de planta inoculada com PVX recombinante com o gene *NSs*.



Figura 3 – Sintomas observados em plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com tospovírus e PVX. A) Mosaico em folhas apicais de planta inoculada com PVX selvagem. B) Clorose e deformação foliar em folhas apicais de planta inoculada com tospovírus. C) Necrose induzida em folhas apicais de planta inoculada com PVX selvagem e tospovírus.

Tabela 2 – Sintomas observados em plantas de *Nicotiana benthaminana* inoculadas com tospovírus ou com o vetor viral PVX, contendo diferentes genes de tospovírus.

Vírus	Genes de tospovírus	Planta	
		B (não-transformada)	B5-5 (Sw-5/Sw-5)
PVX	—	Mos*	Mos
PVX	<i>N</i> (V1-3)	Mos	Mos
PVX	<i>Nsm</i> (V1-3)	Mos	Mos
TCSV (V1-3)		Lc/Vc, Df	Ln, Lc/Ns
PVX	<i>N</i> (Cb)	Mos	Mos
PVX	<i>NSm</i> (Cb)	Mos	Mos
GRSV (Cb)		Lc/Vc, Df	HR/-
PVX	<i>N</i> (AL)	Mos	Mos
PVX	<i>NSm</i> (AL)	Mos	Mos
PVX	<i>NSs</i> (AL)	Ns	Ns
PVX	<i>N+NSm</i> (AL)	Mos	Mos
PVX	<i>N+NSs</i> (AL)	Ns	Ns
PVX	<i>NSm+NSs</i> (AL)	Ns	Ns
PVX	<i>N+NSm+NSs</i> (AL)	Ns	Ns
GRSV (AL)		Lc/Vc, Df	HR/-

* - ausência de sintomas; Df: deformação foliar; HR: resposta de hipersensibilidade; Lc: lesões cloróticas; Ln: lesões necróticas; Mos: mosaico; Ns: Necrose sistêmica; Vc: clorose nas nervuras.

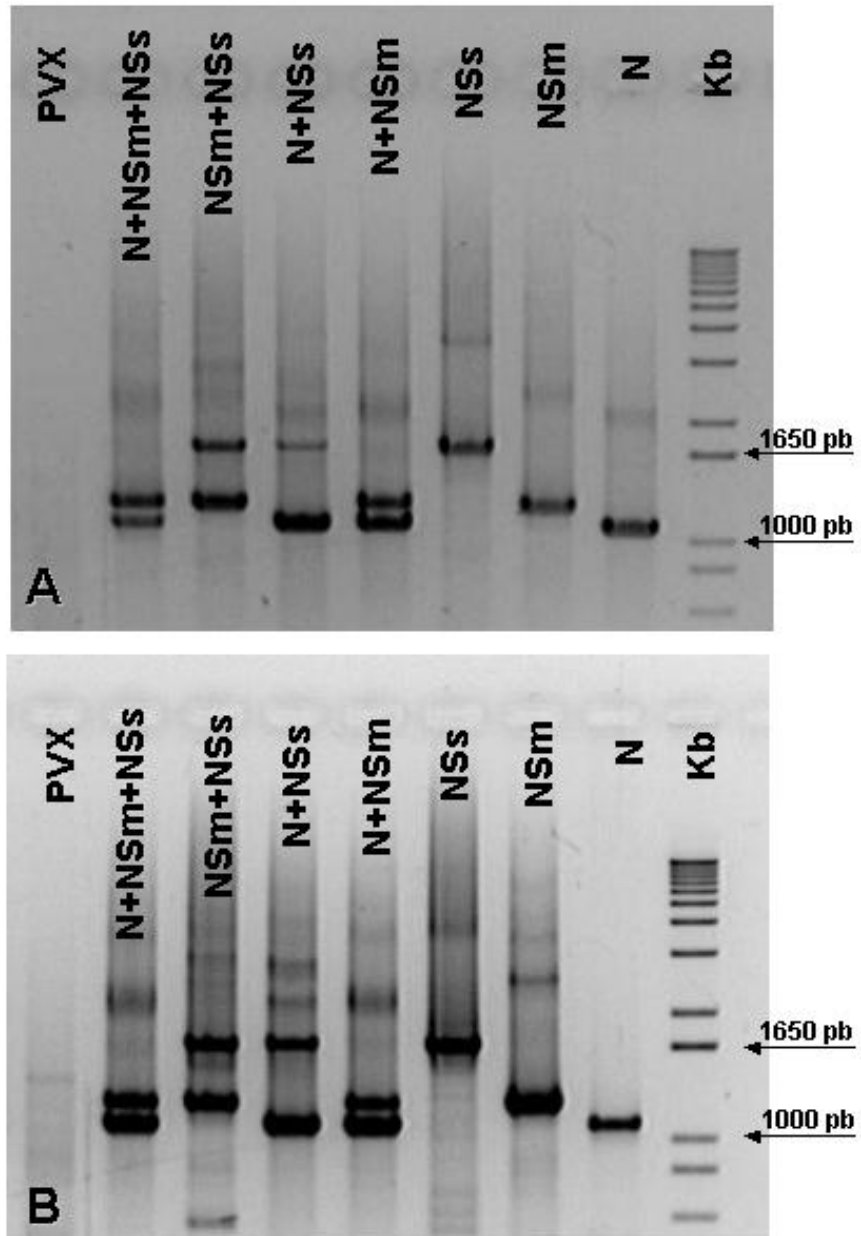


Figura 4 – Detecção da presença dos transcritos correspondentes aos genes de tospovírus em tecidos de *Nicotiana benthamiana*, inoculadas com clones de PVX recombinantes. A presença dos transcritos foi verificada por meio de RT-PCR a partir de RNA total utilizando-se os oligonucleotídeos PVX-F e PVX-R. A) Plantas não-transformadas. B) Plantas transformadas com *Sw-5*. Designações acima de cada linha correspondem aos genes presentes nos respectivos clones recombinantes do vetor viral PVX, utilizados nas inoculações. PVX – Planta inoculada com PVX não-recombinante; Kb – Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder.

Confirmação da expressão transitória da proteína N de tospovírus em *Nicotiana benthamiana*

A presença da proteína N de tospovírus em tecidos de *N. benthamiana* infectados por clones recombinantes de PVX contendo o gene *N*, foi demonstrada por DAS-ELISA utilizando-se anti-soros específicos para as espécies TSWV, TCSV e GRSV. A especificidade de reação dos anti-soros para as proteínas recombinantes foi semelhante à observada para os isolados de tospovírus dos quais o gene foi isolado, indicando que o gene de tospovírus estava sendo adequadamente transcrito por PVX e traduzido pela célula vegetal (Tabela 3). Os isolados Cb e AL (ambos identificados como GRSV) reagiram com dois anti-soros (para GRSV e TCSV), o que pode ser devido à reação cruzada, já que estas duas espécies são relacionadas (De Ávila et al., 1993).

Tabela 3 – Detecção por meio de DAS-ELISA da proteína N de tospovírus em tecidos de *Nicotiana benthamiana*, infectados com clones recombinantes de PVX contendo o gene *N* de três isolados de tospovírus.

Isolado	Anti-soro		
	TSWV	TCSV	GRSV
PVX	0,186*	0,180	0,163
PVX:: <i>N</i> _V1-3	0,203	3,236	0,325
PVX:: <i>N</i> _CB	0,215	0,377	0,836
PVX:: <i>N</i> _AL	0,220	0,337	0,693
Sadia	0,194	0,174	0,164
V1-3	0,252	3,362	0,318
Cb	0,232	0,885	0,939
AL	0,215	0,579	0,848

*Absorbância a 405 nm.

Gama de hospedeiros de PVX::*NSs*

Os clones de PVX recombinantes contendo o gene *NSs* de tospovírus, apresentaram capacidade semelhante de causar infecção sistêmica nas plantas inoculadas. Contudo, o clone senso causou, em algumas solanáceas, sintomas locais e sistêmicos mais severos que os causados pelo clone anti-senso, sendo estes de natureza

necrótica (Tabela 4). Em *Gomphrena globosa* e *Chenopodium quinoa*, ambos os clones causaram apenas lesões locais. Nas duas cultivares de *N. tabacum*, os sintomas causados por ambos os clones recombinantes foram semelhantes, com lesões cloróticas quase imperceptíveis nas folhas inoculadas e, portanto, distintos dos severos sintomas locais e sistêmicos promovidos por tospovírus. Em *Capsicum annuum*, os sintomas locais e sistêmicos, causados por ambos os clones, foram semelhantes e bastante severos. Conforme verificado previamente para *N. benthamiana*, os sintomas causados em *N. glutinosa* e *N. clevelandii* pelo clone recombinante senso, foram mais severos em relação aos sintomas causados pelo clone anti-senso. Em *N. clevelandii*, enquanto o clone anti-senso causou lesões locais cloróticas e mosaico sistêmico (Figura 5A), o clone senso causou lesões necróticas locais e sistêmicas, bem como deformação foliar (Figura 5B). Em tomate, os sintomas locais causados pelo clone senso assemelharam-se muito às lesões necróticas (resposta de hipersensibilidade) formadas em plantas de SW99-1 (*Sw-5/Sw-5*) inoculadas com tospovírus (Figura 5C), embora tenha ocorrido infecção sistêmica do PVX, o que foi evidenciado pelo mosaico nas folhas não-inoculadas (Figura 5D).

Tabela 4 – Gama de hospedeiros de PVX recombinante contendo o gene *NSs* de tospovírus.

Hospedeiro	PVX:: <i>NSs</i> -senso		PVX:: <i>NSs</i> - anti-senso	
	Local	Sistêmico	Local	Sistêmico
Amaranthaceae				
<i>Gomphrena globosa</i>	LN	-	LN	-
Chenopodiaceae				
<i>Chenopodium quinoa</i>	LN	-	LN	-
Solanaceae				
<i>Lycopersicon esculentum</i> 'Rutgers'	LN	MOS	-	MOS
<i>Nicotiana benthamiana</i>	LC, LN	MOS, LN	LC	MOS
<i>Nicotiana clevelandii</i>	LC, LN	MOS, LN	LC	MOS
<i>Nicotiana glutinosa</i>	LC, LN	MOS	LC	MOS
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Havana 425'	LC	-	LC	-
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Samsun'	LC	-	LC	-
<i>Capsicum annuum</i> 'Ikeda'	LC	LC, LN, MOS, DF	LC	LC, LN, MOS, DF

- ausência de sintomas; LC: lesão clorótica; LN: lesão necrótica; DF: deformação foliar; MOS: mosaico.

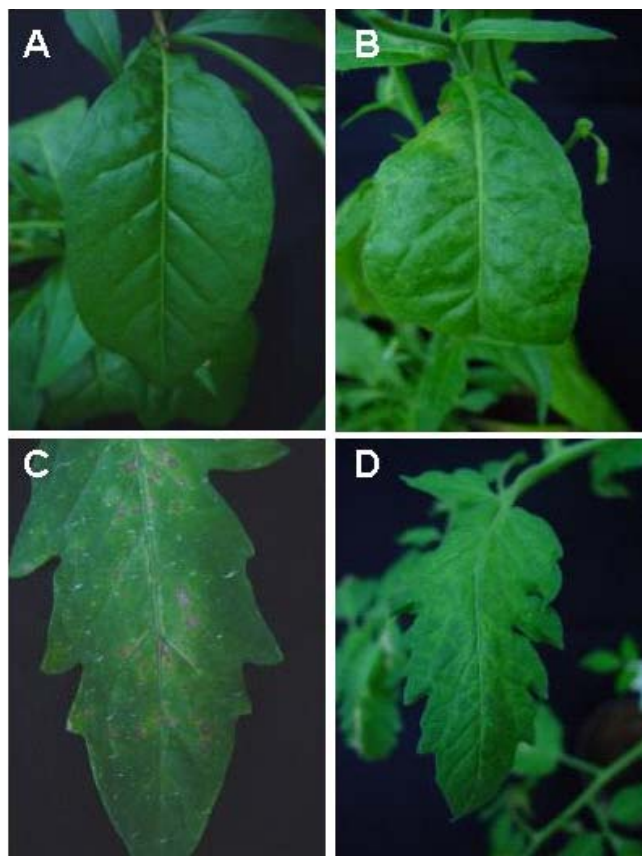


Figura 5 – Sintomas observados em plantas inoculadas com clones recombinantes de PVX contendo o gene *NSs* de tospovírus. A) Mosaico em folhas apicais de *Nicotiana clevelandii* inoculadas com PVX::*NSs* anti-senso. B) Necrose, clorose e deformação foliar em folhas apicais de *Nicotiana clevelandii* inoculadas com PVX::*NSs* senso. C) Necrose local em folhas de *Lycopersicon esculentum* inoculada com PVX::*NSs* – senso. D) Mosaico sistêmico nesta mesma planta.

Análise da proteína NSs do isolado AL

A proteína NSs do isolado AL (GRSV) apresenta 467 aminoácidos. Os aminoácidos 1 a 434 incluem o domínio Bunya_NS-S_2 (pfam03231.10) de *Bunyavirus*. A comparação com as seqüências depositadas no GenBank e EMBL revela sua estreita semelhança (98,7% de identidade) com o isolado TSWV-B, descrito por Pang et al. (1993) (Figura 6). O TSWV-B é oriundo do Brasil e suas características biológicas e moleculares indicavam, à época em que foi descrito, tratar-se de uma espécie nova, hoje denominada *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (De Ávila et al., 1993). O alinhamento das proteínas NSs de isolados de GRSV, TSWV e INSV,

evidencia a variação presente na região carboxi-terminal da proteína NSs (aminoácidos 435 a 467) (Figura 6). Apenas parte desta região é encontrada em *Impatiens necrotic spot virus* (INSV - De Haan et al., 1992) e está ausente nas espécies asiáticas de tospovírus. Esta proteína apresenta 81,1% de identidade com o TSWV brasileiro BR01 (De Haan et al., 1990) e 56,3% com INSV (De Haan et al., 1992), uma espécie de tospovírus presente no Hemisfério Norte, sendo bastante distinta das proteínas NSs presente em espécies de tospovírus originadas na Ásia (Figura 7A). A construção de árvore baseada na identidade geral entre proteínas NSs de várias espécies de tospovírus, permite a visualização de um grupo que inclui as espécies asiáticas e de um grupo contendo os tospovírus presentes na América do Sul (GRSV e TSWV) e um tospovírus do Hemisfério Norte (INSV) (Figura 7B). As análises não incluíram as demais espécies do Brasil (TCSV, CSNV e ZLCV) devido à ausência de seqüências disponíveis.

A

TSWV	100%								
GRSV	81.1%	100%							
INSV	55.8%	56.3%	100%						
WSMV	20.0%	20.5%	21.0%	100%					
PBNV	19.7%	21.0%	20.0%	84.5%	100%				
MYSV	19.8%	18.8%	20.1%	50.3%	50.1%	100%			
IYSV	19.6%	22.3%	22.6%	49.1%	49.3%	40.8%	100%		
PYSV	15.3%	17.2%	18.2%	21.6%	20.9%	18.8%	21.2%	100%	

B

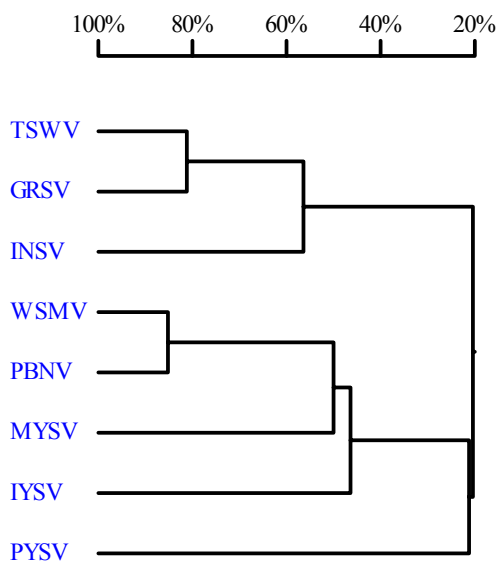


Figura 7 – Relacionamento entre espécies de tospovírus determinado a partir de comparações da proteína NSs. A - Matriz de identidade de aminoácidos da proteína NSs de tospovírus. B – Árvore construída com base na identidade de aminoácidos da proteína NSs de tospovírus. GRSV (*Groundnut ringspot virus* - isolado AL seqüenciado neste trabalho), TSWV (*Tomato spotted wilt virus* - De Haan et al., 1990), INSV (*Impatiens necrotic spot virus* - De Haan et al., 1992), MYSV (*Melon yellow spot virus* – Kato et al., 2000), PBNV (*Peanut bud necrosis virus* -Satyanarayana et al., 1996), WSMV (*Watermelon silver mottle virus* - Yeh e Chang, 1996), IYSV (*Iris yellow spot virus* - Cortês et al., 1998) e *Peanut yellow spot virus* (PYSV) (Satyanarayana et al., 1998).

DISCUSSÃO

A expressão isolada de genes de um dado patógeno em plantas contendo o respectivo gene de resistência, pode permitir a detecção do gene cuja proteína atua como elicitadora das respostas de defesa da planta. Isto pode ser evidenciado pela visualização da resposta de hipersensibilidade (Tang et al., 1996; Abbink et al., 1998; Mestre et al., 2000), bem como pela contenção do organismo recombinante contendo o gene de avirulência (Kamoun et al., 1999; Tobias et al., 1999). Os sintomas causados em plantas de *N. benthamiana* transformadas com *Sw-5* pelos clones de PVX contendo os genes *N*, *NSm* e *NSs* de tospovírus, em nada diferiram daqueles observados em plantas não-transformadas, quer seja na infecção isolada de cada um dos clones, como também nas infecções mistas envolvendo combinações dos diversos clones. A diferença entre tais plantas só foi evidenciada quando da inoculação com o isolado de tospovírus, a partir do qual os genes foram isolados. Neste caso, a resposta de hipersensibilidade foi evidente em plantas contendo *Sw-5*. Em plantas com *Sw-5* não houve restrição à infecção sistêmica dos diferentes clones recombinantes de PVX. A incapacidade destes genes em elicitar a resposta de hipersensibilidade ou ativar mecanismos de defesa que impedissem a infecção do PVX recombinante, indicam que nenhum destes genes de tospovírus é o gene de avirulência da interação *Sw-5* – tospovírus. Dois outros genes ainda apresentam-se como potenciais candidatos a gene de avirulência desta interação: o gene que codifica a polimerase viral (proteína L) e o gene que codifica as glicoproteínas do envelope (proteínas G1 e G2). Estudos envolvendo pseudo-recombinantes de tospovírus indicam que a capacidade de uma estirpe de TSWV em evitar a resistência conferida por *Sw-5*, está relacionada ao RNA M (Hoffmann et al., 2001). Como o RNA M contém os genes *NSm* e *G1/G2*, e o presente trabalho indica que o gene *NSm* não codifica a molécula elicitadora, é possível que *G1/G2* seja o gene de avirulência de tospovírus.

Os tospovírus induzem diversos sintomas em seus hospedeiros. Tais sintomas podem ter uma relação evidente com a atividade de uma proteína em específico, ou serem decorrentes das múltiplas alterações da fisiologia da célula e dos tecidos da planta durante o processo de infecção viral. A obtenção de clones PVX contendo diferentes genes de tospovírus permitiu avaliar a possível contribuição de cada um destes genes nos sintomas causados por tospovírus. Dos clones recombinantes de PVX (contendo os genes *N*, *NSm* ou *NSs* de tospovírus) inoculados em *Nicotiana benthamiana*, o único

que causou sintomas diferentes em relação ao PVX selvagem foi o que continha o gene *NSs*. Nas infecções mistas, envolvendo combinações dos clones recombinantes contendo os diferentes genes, não foi observado nenhum sintoma diferente daqueles causados pelos clones individuais, mas apenas à atenuação dos efeitos do clone PVX:*NSs*.

A proteína NSm, responsável pela movimentação do vírus na planta, e a proteína NSs, capaz de suprimir silenciamento gênico, podem ter relação direta com alguns dos sintomas causados por tospovírus. A proteína NSm forma túbulos nos plasmodesmas, pelos quais o RNA dos tospovírus é transportado. As modificações promovidas por NSm nestas estruturas celulares podem ser a origem da dificuldade de obtenção de plantas transgênicas expressando esta proteína, assim como do nanismo das plantas obtidas (Van Poelwijk et al., 1996). Ao contrário destes relatos, no presente trabalho, os clones de PVX contendo o gene *NSm* de tospovírus causaram os mesmos sintomas que PVX selvagem. Talvez os efeitos desta proteína sobre a fisiologia da planta sejam mais pronunciados apenas se ela for expressa desde o início do desenvolvimento. Assim, o fato de plantas desenvolvidas terem sido inoculadas pode ter sido o motivo pelo qual nenhum efeito além dos promovidos pela infecção de PVX ter sido observado.

A primeira associação entre os sintomas de tospovírus e a proteína NSs, foi a visualização de um maior acúmulo desta proteína nas células de plantas infectadas por isolados mais agressivos (Kormelink et al., 1991). A proteína NSs é uma proteína não-estrutural (ausente na partícula) dos tospovírus. É codificada pelo RNA S no sentido viral (De Haan et al., 1990), sendo expressa em plantas e no inseto-vetor (tripes) (Kormelink et al., 1991; Lawson et al., 1996; Ullman et al., 1993, 1995). Em plantas, esta proteína acumula-se em inclusões de aspecto fibrilar. Até recentemente, sua função era desconhecida, sendo postulado que poderia atuar em alguma etapa da replicação do vírus ou, devido à sua variabilidade, estar envolvida com a determinação da gama de hospedeiros (Van Poelwijk et al., 1996). Recentemente, foi demonstrado que esta proteína tem a capacidade de suprimir o processo de silenciamento gênico (Takeda et al., 2002). A expressão transitória de NSs faz com que plantas transgênicas silenciadas para GFP voltem a expressar o transgene. Além disso, a ausência de pequenos RNAs interferentes (siRNAs) nas áreas infiltradas, corrobora a hipótese de que esta proteína interfere no mecanismo de silenciamento de RNA (Bucher et al., 2003). A demonstração de que esta proteína apresenta a capacidade de suprimir silenciamento gênico apoia a hipótese de relação entre NSs e a severidade dos sintomas causados por

tospovírus, uma vez que outras proteínas virais supressoras de silenciamento gênico têm capacidade de aumentar a severidade dos sintomas causados pelo vírus que as expressa (Brigneti et al., 1998). Em acordo com estas observações, os sintomas causados pelo clone PVX contendo o gene *NSs* foram muito mais severos do que os verificados para PVX selvagem. Diferente do mosaico típico de infecções por PVX, observou-se uma severa necrose dos tecidos infectados.

A expressão transitória da proteína *NSs* em tecido vegetal, não é suficiente para desencadear necrose (Takeda et al., 2002; Bucher et al., 2003); assim, é possível que a necrose promovida por PVX::*NSs* seja consequência indireta da supressão do silenciamento gênico por *NSs*. Como inibidora do silenciamento gênico, *NSs* poderia favorecer a infecção viral, permitindo maior acúmulo do PVX. O desgaste metabólico, decorrente deste acúmulo, poderia resultar no colapso de células e tecidos. No presente trabalho, o título de PVX não foi determinado, porém outras proteínas virais supressoras de silenciamento demonstram-se capazes de aumentar o título de diferentes vírus. Por exemplo, verificou-se o aumento do acúmulo de *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) e PVX em protoplastos obtidos a partir de plantas transgênicas expressando a proteína HC-Pro (Pruss et al., 1997). Ainda, tanto a proteína HC-Pro quanto 2b de cucumovírus, quando expressas a partir de PVX, permitiram maior acúmulo deste vírus na planta e os sintomas resultantes da infecção viral se tornaram mais severos (Brigneti et al., 1998). Assim, os casos de sinergismo em infecções mistas envolvendo PVX e potyvírus têm sua origem nas proteínas supressoras de silenciamento, que atuam desativando mecanismos de defesas das plantas favorecendo a infecção viral (Pruss et al., 1997). A relação tospovírus-PVX pode apresentar o mesmo padrão, pois a infecção mista de PVX e tospovírus resultou em sintomas mais severos (com necrose das folhas infectadas) do que os observados quando estes vírus são inoculados separadamente. Tais sintomas podem ser devido a atividade da proteína *NSs* dos tospovírus e estão em acordo com a hipótese de que a necrose resulta do maior acúmulo do vírus na célula.

Algumas observações, no entanto, favorecem a hipótese de que a proteína *NSs* poderia ter algum tipo de atividade necrogênica. Clones PVX com a proteína supressora de silenciamento C2 de TYLCV-C, não apresentam seu título viral aumentado (Dong et al., 2003). Estes autores conseguiram identificar mutantes para a proteína C2 que são capazes de induzir necrose, porém incapazes de suprimir o silenciamento gênico, indicando que estes fenômenos podem ter origens distintas. Ademais, análises

demonstraram que a proteína NSs dos bunyavírus apresenta similaridade com a proteína Reaper de *Drosophila*, a qual tem atividade pro-apoptótica. Assim como Reaper, a proteína NSs induz ativação de caspases e, quando expressa em ratos, promove apoptose de células neuronais e aumento da mortalidade. Aparentemente, a indução de apoptose por NSs ocorre por um mecanismo similar ao utilizado por Reaper, uma vez que ambas as proteínas apresentam capacidade de se ligar a regulador de apoptose denominado Scythe (Cólon-Ramos et al., 2003). Desta forma, uma explicação alternativa, contrária a exposta acima, é que não seria a presença da proteína NSs que permitiria o maior acúmulo de PVX, e sim PVX propiciaria o maior acúmulo da proteína NSs, em níveis tais que a proteína induziria necrose da célula. Assim, supostamente nas infecções dos tospovírus, devido à característica de regulação da transcrição destes vírus, os níveis desta proteína poderiam ser menores e, por isso, os sintomas não seriam tão severos. Aqueles isolados capazes acumular NSs em maior quantidade, causariam sintomas mais severos. Esta hipótese também justificaria os sintomas mais brandos, observados em infecções mistas envolvendo os diferentes clones de PVX recombinantes, quando comparados aos severos sintomas observados durante as infecções simples apenas com PVX::NSs: a competição entre os clones recombinantes nos tecidos da planta reduziria a quantidade da proteína NSs.

Uma vez que o processo de silenciamento gênico é um mecanismo de defesa de plantas a vírus, as proteínas virais inibidoras deste processo são um contra-ataque muitas vezes necessário à infecção viral (Vance e Vaucheret, 2001). A hipótese de que a proteína NSs é determinante da gama de hospedeiro dos tospovírus, foi testada por meio da avaliação da gama de hospedeiros do clone de PVX recombinante expressando o gene *NSs*. A capacidade deste clone de causar infecção sistêmica nas plantas avaliadas foi semelhante a observada para o clone contendo gene *NSs* na orientação anti-senso, porém em algumas plantas da família Solanaceae, assim como descrito para *N. benthamiana*, os sintomas foram mais severos. É possível que em tais plantas, a presença de NSs tenha favorecido a infecção por PVX. Para as plantas em que a presença de NSs não resultou em alteração dos sintomas, pode ser que outro fator não relacionado ao silenciamento gênico esteja envolvido com incapacidade de PVX de causar infecção sistêmica.

O isolado AL, originário do Nordeste brasileiro, pertence à espécie GRSV (Lima et al., 2002). A comparação da seqüência de aminoácidos da proteína NSs deste isolado, revelou sua elevada identidade (98,7%) com o isolado TSWV-B. Este também é

originário do Brasil e seu RNA S foi seqüenciado em 1993 (Pang et al., 1993). À época, apresentava-se como uma espécie nova que foi descrita como GRSV (De Ávila et al., 1993). A proteína NSs é comparativamente mais variável do que a proteína N (utilizada na classificação taxonômica de tospovírus). Contudo, os padrões de agrupamento de árvores construídas com base na identidade geral destas duas proteínas, foram idênticos. Assim como na análise para a proteína NSm (Silva et al., 2001), observa-se a formação de um grupo que contém a espécies provenientes das Américas (Novo Mundo) e um segundo grande grupo, que contém espécies da Ásia e Europa (Velho Mundo). As comparações para estas três proteínas indicam a evolução em conjunto do genoma dos tospovírus.

LITERATURA CITADA

- ABBINK, T.E., TJERNBERG, P.A., BOL, J.F., LINTHORST, H.J.M. *Tobacco mosaic virus* helicase domain induces necrosis in *N* gene-carrying tobacco in the absence of virus replication. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.1242-1246, 1998.
- BERZAL-HERRANZ, A., DE LA CRUZ, A., TENLLADO, F., DIAZ-RUIZ, J.R., LOPEZ, L., SANZ, A.I., VAQUERO, C., SERRA, M.T., GARCIA-LUQUE, I. The *Capsicum* *L*³ gene-mediated resistance against tobamoviruses is elicited by coat protein. **Virology**, v.209, p.498-505, 1995.
- BEZERRA, I.C., RESENDE, R. de 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**, v.89, p.823-830, 1999.
- BRIGNETI, G., VOINNET, O., LI, L-H., DING, S-W., BAULCOMBE, D.C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **The EMBO Journal**, v.17, p.6739-6746, 1998.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., TANKSLEY, S.D., FRARY, A., FRARY, A. OTONI, W.C., CHEAVEGATTI, A. Positional cloning, molecular characterization and heterologous expression of the tospovirus resistance gene *Sw-5*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998. Edinburgh, Scotland. **Proceedings...** Edinburgh, 1998, v.3. p.54.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., FRARY, A., 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**, v.13, p.1130-1138, 2000.

- BUCHER, E., SIJEN, T., DE HAAN, P., GOLDBACH, R., PRINS, M. Negative – strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a supressor of gene silencing at analogous genomic positions. **Journal of General Virology**, v.77, p.1329-1336, 2003.
- CLARK, M.F., ADAMS, A.N. Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal General Virology**, v.34, p.475-483, 1977.
- COLÓN-RAMOS D.A., IRUSTA, P.M., GAN, E.C., OLSON, M.R., SONG, J., MORIMOTO R.I., ELLIOTT, R.M., LOMBARD, M., HOLLINGSWORTH, R., HARDWICK, J.M., SMITH, G.K., KORNBLUTH, S. Inhibition of Translation and Induction of Apoptosis by Bunyaviral Nonstructural Proteins Bearing Sequence Similarity to Reaper. **Molecular Biology of the Cell**, v.14, p.4162-4172, 2003.
- CORTÊS, I., LIVIERATOS, I.C., DERKS, A. PETERS, D., KORMELINK, R. Molecular and serological characterization of *Iris yellow spot virus*, a new and distinct tospovirus species. **Phytopahtology**, v.88, p.1276-1282, 1998.
- CULVER, J.N., LINDBECK, A.G.C, DAWSON, W.O. Virus-host interactions: induction of chlorotic and necrotic responses in plant by tobamovirus. **Annual Review of Phytopathology**, v.29, p.193-217, 1991.
- DE ÁVILA, A.C., DE HAAN, P., SMEETS, M.L.L., RESENDE, R. de O., KITAJIMA, E.W., GOLDBACH, R.W., PETERS, D. Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. **Archives of Virology**, v.128, p.211-227, 1993a.
- DE ÁVILA, A.C., DE HAAN, P., KORMELINK, R., RESENDE, R. de O., GOLDBACH, R.W., PETERS, D. Classification of tospoviruses based on the phylogeny of nucleocapsid gene sequences. **Journal of General Virology**, v.74, p.153-159, 1993b.
- DE HAAN, P., KORMELINK, R., RESENDE, R.O., VAN POELWIJK, F. PETERS, D., GOLDBACH, R. *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal of General Virology**, v.71, p.2207-2216, 1991.
- DE HAAN, P., WAGEMAKERS, L., PETERS, D., GOLDBACH, R. The S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. **Journal of General Virology**, v.71, p.1001-1007, 1990.
- DE HAAN, P. DE ÁVILA, A.C., KORMELINK, R., WESTRBROEK, A; GIELEN, J. J.L.; PETRS, D.; GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the S RNA of *Impatiens necrotic spot virus*, a novel tospovirus. **FEBS letters**, v.306, p.27-32, 1992.
- DE LA CRUZ, A., LÓPEZ, L., TENLLADO, F., DÍAZ-RUÍZ, J.R., SANZ, A.L., VAQUERO, C., SERRA, M.T., GARCIA-LUQUE, I. The coat protein is required for the elicitation of the *Capsicum L²* gene-mediated resistance against the tobamoviruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.107-113, 1997.

- DONG, X., VAN WEZEL R., STANLEY, J. HONG, Y. Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing **Journal of Virology**, v.77, p.7026-7033, 2003.
- EIRAS, M. **Detecção de tospovirus através de “Polymerase Chain Reaction” (PCR) e sondas moleculares**. Brasília, DF: UNB, 1997. 75p. Dissertação (Tese de Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Brasília, 1997.
- ERICKSON, F.L., HOLZBERG, S, CALDERON-URREA, A., HANDLEY, V., AXTELL, M., CORR, C., BAKER, B. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. **The Plant Journal**, v.18, p.67-75, 1999.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.
- GERMAN, T.L., ULLMAN, D.E., MOYER, J.W. *Tospoviruses*: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.315-348, 1992.
- GOLDBACH, R., PETERS, D. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. **Seminars in Virology**, v.5, p.113-120, 1994.
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.
- 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**, v.14, p.242-249, 2001.
- KAMOUN, S., HONEÉ, G., WEIDE, R., LAUGÉ, R. KOOMAN-GERSMANN, M., DE GROOT, K., GOVERS, F., DE WIT, P.G.M. The fungal gene *avr9* and oomycet gene *infl* confer avirulence to *Potato virus X* on tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.459-462, 1999.
- KATO, K., HANADA, K., KAMEYA-YWAKI, M. *Melon yellow spot virus*: a distinct species of the genus tospovirus isolated from melon. **Phytopathology**, v.90, p.422-426, 2000.
- KIKKERT, M., VAN LENT, J., STORMS, M., BODEGOM, P., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. *Tomato spotted wilt virus* particle morphogenesis in plant cells. **Journal of Virology**, v.73, p.2288-2297, 1999.
- KORMELINK, R., KITAJIMA, E.W., DE HAAN, P., ZUIDEMA, D., PETERS, D., GOLDBACH, R. The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* is associated with fibrous structures in infected plant cells. **Virology**, v.181, p.459-468, 1991.

- KORMELINK, R., DE HAAN, P., MEURS, C., PETERS, D., GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of *Tomato spotted wilt virus*, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **Journal of General Virology**, v.73, p.2795-2804, 1992.
- KORMELINK, R., STORMS, M., VAN LENT, J., PETERS, D., GOLDBACH, R. Expression and subcellular location of the NS_m protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology**, v.200, p.56-65, 1994.
- KUROZAWA, C., PAVAN, M.A. Doenças das Solanáceas. In: KIMATI, H., AMORIN, L. BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (ed.) **Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. v.2. p. 665-675. 1997.
- LANE, L.C. A general method for detecting plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.) **Plant disease of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin**. New Delhi, India: Oxford and IPH Publishing, 1992. p.3-17.
- LAU, D. **Análise de fatores que influenciam a resistência a tospovírus conferida pelo gene Sw-5 em tomateiro e tabaco**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 84p. Dissertação (Tese de Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LAWSON, R.H., DIENELT, M.M., HSU, H.T. Cytopathology of Tospovirus-Host-Plant Interactions. **Acta Horticulturae**, v.431, p.267-290, 1996.
- LIMA, G.S.A, LAU, D, PICOLI, E.A.T., ASSUNÇÃO, I.P., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C. Reação de genótipos de berinjela a quatro espécies de tospovírus **Summa Phytopathologica**, v.28, p.242-247, 2002.
- LOPES, C.A., SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 67p.
- MAISS, E., IVANOVA, L., BREYEL, E., ADAM, G. Cloning and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of *Tomato spotted wilt virus*. **Journal of General Virology**, v.72, p.461-464, 1991.
- MARTIN, G.B., BOGDANOVE, A.J., SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p.23-61, 2003.
- MESTRE, P., BRIGNETI, G., BAULCOMBE, D.C. An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the *Nia* proteinase from *Potato virus Y*. **Plant Journal**, v.23, p.653-661, 2000.
- OLESINSKI, A. A., LUCAS, W.J., GALUN, E., WOLF, S. Pleiotropic effects of *Tobacco mosaic virus* movement protein on carbon metabolism in transgenic tobacco plants. **Planta**, v.197, p.118-126, 1995.

- PADGETT, H.S., WATANABE, Y., BEACHY, R. N. Identification of the TMV replicase sequence that activates the *N* gene-mediated hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.709-715, 1997.
- PANG, A-Z., SLIGHTOM, J.L., GONSALVES, D. The biological properties of a distinct tospovirus and sequence analysis of its S RNA. **Phytopathology**, v.83, p.728-733, 1993.
- PETERS, D., WIJKAMP, I., VAN DE WETWRING, F., GOLDBACH, R. Vector relations in the transmission and epidemiology of tospoviruses. **Acta Horticulturae**, v.431, p.29-43, 1996.
- PICOLI, E.A.T., LIMA, G.S.A., LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C., ZERBINI, F.M. Heterologous expression of the *Sw-5* gene in eggplant (*Solanum melongena* L.) confers resistance to *tospovirus* infection. In: X ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 1999, Curitiba. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 1999, p.155.
- POZZER, L., RESENDE, R DE O., LIMA, M.I., KITAJIMA, E., GIORDANO, L. DE B., DE ÁVILA, A.C. Tospovirus: uma visão atualizada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.95-148, 1996.
- PRUSS, G., GE, X., SHI, X.M., CARRINGTON, J.C., VANCE, V.B. Plant viral synergism the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, v.9, p.859-868, 1997.
- QIU, W.P., GESKE, S.M., HICKEY, C.M., MOYER, J.W. *Tomato spotted wilt tospovirus* genome reassortment and genome segment-specific adaptation. **Virology**, v.244, p.186-194, 1998.
- RESENDE, R. de O., DE HAAN, P., DE ÁVILA, 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**, v.72, p. 2375-2383, 1991.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SATYANARAYANA, T, MITCHELL, S.E., REDDY, D.V.R., KRESOVICH, S., JARRET, R., NAIDU, R.A., GOWDA, S., DEMSKI, J.W. *Peanut bud necrosis tospovirus* S RNA: complete nucleotide sequence, genome organization and homology to other tospoviruses. **Archives of Virology**, v.141, p.85-98, 1996.
- SATYANARAYANA, T., GOWDA, S., REDDY, K.L., MITCHELL, S.E., DAWSON, W.O., REDDY, D.V.R. *Peanut yellow spot virus* is a member of a new serogroup V of the *Tospovirus* genus based on small (S) RNA sequence and organization. **Archives of Virology**, v.143, p.353-364, 1998.

- SILVA, M.S., MARTINS, C.R.F., BEZERRA, I.C., NAGATA, T., DE ÁVILA, A.C., RESENDE, R.O. Sequence diversity of NSm movement protein of tospoviruses. **Archives of Virology**, v.146, p.1267-1281, 2001.
- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, 1973.
- SOELLICK, T.-R., UHRIG, J.F., BUCHER, G.L., KELLMANN, J.-W., SCHREIER, P.H. The movement protein NSM of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.97, p.2373-2378, 2000.
- STORMS, M.M.H., KORMELINK, R., PETERS, D., VAN LENT, J.W.M., GOLDBACH, R. The nonstructural NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. **Virology**, v.214, p.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**, v.532, p.75-79, 2002.
- TANG, X, FREDERICK, R.D., ZHOU, J., HALTERMAN, D.A., JIA, Y., MARTIN, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. **Science**, v.274, p.2060-2063, 1996.
- TOBIAS, C.M., OLDROYD, G.E.D., CHANG, J.H., STASKAWICZ, B.J. Plants expressing the *Pto* disease resistance gene confer resistance to recombinant PVX containing the avirulence gene *AvrPto*. **Plant Journal**, v.17, p.41-50, 1999.
- TORTO, T.A., LI, S., STYER, A., HUITEMA, E., TESTA, A., GOW, N.A.R., VAN WEST, P., KAMOUN, S. EST Mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. **Genome Research**, v.13, p.1675-1685, 2003.
- ULLMAN, D.E., DAPHANE, M.W., CHENAULT, K.D., SHERWOOD, J.L., GERMAN, T.L., BANDLA, M.D., CANTONE, F.A., DUER, H.L. Compartmentalization, intracellular transport, and autophagy of *Tomato spotted wilt virus* proteins in infected thrips cells. **Phytopathology**, v.85, p.644-654, 1995.
- 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 S RNA of *Tomato spotted wilt virus* is present in thrips vector cells. **Phytopathology**, v.83, p.456-463, 1993.
- VAN POELWIJCK, F., DE HAAN, P., KIKKERT, M., PRINS, M., KORMELINK, R., STORMS, M., VAN LENT, JAN., PETERS, D., GOLDBACH, R. Replication and expression of tospoviral genome. **Acta Horticulturae**, v.431, p.201-208, 1996.
- VANCE, V., VAUCHERET, H. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. **Science**, v.292, p.2277-2280, 2001.

- WEBER, H., PFITZNER, A.J.P. *Tm-2²* resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of *Tomato mosaic virus*. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v.11, p.498-503, 1998.
- WEBER, H., SCHULTZE, S., PFITZNER, A.J.P. Two amino acid substitutions in the *Tomato mosaic virus* 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the *Tm-2²* resistance gene in tomato. **Journal of Virology**, v.67, p.6432-6438, 1993.
- WEINTRAUB, M., KEMP, W.G., RAGETLI, H.W.J. Conditions for systemic invasion of a hypersensitive host. **Phytopathology**, v.53, p.618, 1963.
- YEH, S.D., CHANG, T.F. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the S RNA of *Watermelon silver mottle virus*. **Acta Horticulturae**, v.431, p.244-260, 1996.

CAPÍTULO 3

INTERFERÊNCIA NA RESISTÊNCIA MEDIADA POR *Sw-5*, POR MEIO DA CO-EXPRESSION TRANSITÓRIA DE VERSÕES TRUNCADAS DO GENE

Douglas Lau¹, Elene Yamazaki Lau¹, Sérgio Hermínio Brommonschenkel¹, Francisco Murilo Zerbini Jr.¹

¹Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG; Brasil. (Autor para correspondência: shbromo@ufv.br).

RESUMO

A resistência a tospovírus conferida pelo gene *Sw-5* é afetada por fatores ambientais, do patógeno e do hospedeiro. Dependendo do isolado viral, a heterozigose do loco e temperaturas elevadas favorecem a infecção sistêmica de tospovírus em plantas com *Sw-5*. Nestas situações, ao invés de lesões necróticas restritas às folhas inoculadas, observa-se necrose generalizada dos tecidos da planta. Neste trabalho, verificou-se que a co-expressão da região 5' de *Sw-5* foi capaz de comprometer a resistência permitindo a infecção sistêmica por tospovírus. Plantas de *Nicotiana benthamiana*, transformadas com a ORF *Sw-5* e pré-inoculadas com clones de PVX contendo um fragmento de 1.125 pb correspondente à região 5' de *Sw-5* exibiram, após inoculação com tospovírus, necrose sistêmica dos tecidos. Os controles, plantas inoculadas somente com tospovírus ou infecção mista envolvendo tospovírus e PVX selvagem, apresentaram apenas reações locais de hipersensibilidade. O fato de a interferência na resistência ter sido causada por clones PVX contendo o fragmento 5' de *Sw-5* tanto na orientação senso quanto anti-senso sugere que algum mecanismo em nível de RNA foi o responsável por este efeito. Como a resistência mediada por *Sw-5* é influenciada pelos níveis de expressão gênica, é possível que a redução nos níveis de mRNA de *Sw-5*, ocasionado por silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), esteja envolvido neste processo. No entanto, análise de *Northern blot* não evidenciou alteração nos níveis de mRNA correspondentes à região 5' de *Sw-5*.

Palavras-chave: resposta de hipersensibilidade, tospovírus, VIGS.

INTRODUÇÃO

O gene *Sw-5*, originário do tomateiro selvagem *Lycopersicon peruvianum*, confere resistência a várias espécies do gênero *Tospovirus* (Stevens et al., 1992; Boiteux e Giordano, 1993). A resistência é manifestada pela ausência de sintomas ou pelo aparecimento de lesões necróticas nas folhas inoculadas (Stevens et al., 1992) e contenção do vírus próximo ao sítio de infecção (Lau, 2001).

O gene *Sw-5* codifica uma proteína de 1.246 aminoácidos, contendo domínios NBS (*nucleotide binding site*) e LRR (*leucine-rich repeats*) (Brommonschenkel et al., 2000). É, portanto, similar às proteínas Mi (Milligan et al., 1998), I2C (Ori et al., 1997), RPM1 (Grant et al., 1995), Prf (Salmeron et al., 1996) e Rx (Bendahmane et al., 1999), envolvidas na resistência a nematóide, fungo, bactérias e vírus, respectivamente. Na presença do patógeno ou do elicitor específico, estas proteínas atuam desencadeando cascatas de sinalização que resultam no aumento intracelular da concentração de formas reativas de oxigênio, fortalecimento de paredes celulares, produção de substâncias antimicrobianas e proteínas PR (proteínas relacionadas à patogênese), bem como de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico (Hutcheson, 1998; Hammond-Kosack e Jones, 1996; Ryals et al., 1996). Todo este processo pode, muitas vezes, ser visualizado macroscopicamente na forma de lesões necróticas restritas ao sítio de infecção (resposta de hipersensibilidade, HR).

Embora a resposta de hipersensibilidade esteja normalmente associada à resistência, sua presença não é condição *sine qua non*. No caso do gene *Rx*, por exemplo, HR só é observada quando da expressão isolada da molécula elicitora (proteína do capsídeo viral). Em infecções de PVX, plantas resistentes não exibem qualquer sintoma, indicando que os mecanismos de defesa independem da HR (Bendahmane et al., 1999). Assim, HR apresenta-se como um fenômeno secundário, que ocorre quando os mecanismos de defesa são incapazes de conter a multiplicação do patógeno, permitindo o aumento do acúmulo de moléculas elicitoras e, conseqüentemente, atingindo um limiar de sinalização celular que conduz à morte das células. Este processo pode ter papel de amplificador da sinalização e ativação de respostas múltiplas de defesa (Yu et al., 1998; Bendahmane et al., 1999). Por outro lado, a presença da HR não indica que a planta será resistente. Existem várias observações, envolvendo genes que conferem resistência a vírus, em que o desencadeamento da HR não é suficiente para conter a infecção sistêmica (Dinesh-Kumar e Baker, 2000; Vidal et

al., 2002; Collmer et al., 2000). O tempo e a intensidade de ativação das respostas de defesa devem ser fundamentais para a contenção do patógeno, e fatores que afetem este processo podem levar a um *continuum* de respostas que vai da extrema resistência a completa suscetibilidade (Bendahmane et al., 1999; Collmer et al., 2000).

Assim como para outros genes R, a resistência conferida por *Sw-5* é afetada por fatores ambientais, do patógeno e do hospedeiro. A elevação da temperatura, o aumento da concentração de inóculo e a heterozigose do loco são condições em que a infecção sistêmica de tospovírus em plantas com *Sw-5* é observada (Roselló et al., 1997; Lau, 2001). A influência destes fatores é mais evidente dependendo do isolado viral e do *background* genético do hospedeiro. Por exemplo, em tomateiro o efeito da temperatura e da heterozigose do loco foi observado apenas para um isolado (Lau, 2001). O efeito do *background* genético é evidenciado quando da expressão heteróloga do gene. Assim, embora funcional em *Nicotiana tabacum*, a resistência conferida por *Sw-5* nestas plantas, apresenta um espectro mais restrito do que o observado em tomateiro (sistema homólogo) (Brommonschenkel et al., 1998). Esta incapacidade de *Sw-5* de ativar a resposta de hipersensibilidade a determinados isolados de tospovírus, pode ser devido a menor funcionalidade da proteína de resistência em sistema heterólogo. Supostamente, o aumento da expressão gênica é capaz de compensar estas deficiências, pois o espectro da resistência foi restituído em uma progênie de tabaco com duas inserções do transgene. Assim, o efeito da heterozigose do loco e a restituição do amplo espectro da resistência em tabaco com duas inserções do gene *Sw-5* (Oliveira et al., 2001; Yamazaki, 2001), sugerem que o nível de expressão gênica do gene pode afetar a resistência.

O gene *Sw-5* também confere resistência a tospovírus em *N. benthamiana* (Capítulo 1). Assim como tomate, plantas transgênicas de *N. benthamiana* com *Sw-5* exibem reações locais necróticas nas folhas inoculadas com tospovírus e não apresentam sinais de infecção sistêmica. Certos isolados, porém, induzem lesões necróticas/cloróticas de aspecto irregular e são capazes de causar infecção sistêmica de natureza necrótica (Capítulo 1). No presente trabalho, verificou-se que a expressão, via vetor PVX da região 5' de *Sw-5* em plantas de *N. benthamiana* transgênicas contendo o gene *Sw-5*, foi capaz de afetar a resistência permitindo a infecção sistêmica de tospovírus. Como a resistência mediada por *Sw-5* é, supostamente, influenciada pelos níveis de expressão gênica, é possível que a redução nos níveis de mRNA de *Sw-5*

ocasionado por silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), seja a causa da interferência na resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, isolados e inoculação de tospovírus

A co-expressão da seqüência da região 5' do gene *Sw-5* foi conduzida em plantas transgênicas de *N. benthamiana* da linhagem B5-5, que contém uma inserção de *Sw-5* em homozigose (caracterizadas no Capítulo 1 desta Dissertação), bem como em plantas não-transformadas.

Os isolados de tospovírus Cb e AL (*Groundnut ringspot virus*, GRSV), utilizados neste trabalho, são originários do Brasil e fazem parte da coleção do Laboratório de Genética da Interação-Planta Patógeno (BIOAGRO/UFV), sendo sua identificação baseada no seqüenciamento do gene *N* (nucleocapsídeo). O número de acesso da seqüência do nucleocapsídeo dos isolados é dado a seguir: Cb (AF251271) e AL (AF513219). Os isolados foram inoculados via extrato vegetal tamponado. O inóculo original, mantido a -80°C , foi previamente multiplicado em *N. tabacum* 'Havana 425'. Folhas infectadas foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,01 M e carborundum 600 mesh. O extrato foi esfregado sobre as folhas de *N. benthamiana* com auxílio de gaze.

Clonagem da região 5' de *Sw-5* em pGR106

A partir do clone cosmídeo TC134-8 que contém a região genômica de tomateiro que inclui *Sw-5* (Brommonschenkel et al., 2000), um fragmento de 1.125 pares de bases (pb) correspondente à região 5' de *Sw-5*, foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B (5'-GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG-3') e FP12 (5'-AGG ATT TGT AGT ACG TCT CAA CTT G-3'). O fragmento clonado no vetor pGEM-T (Promega) foi liberado com a enzima *Not I* e ligado ao vetor pGR106 (cDNA do PVX clonado em vetor binário; <http://www.jic.bbsrc.ac.uk/Sainsbury-Lab/david-baulcombe/Services/vigsprotocol.htm>) clivado com a mesma enzima (Figura 1). Os plasmídeos recombinantes obtidos foram purificados e transferidos, por eletroporação, para a estirpe GV3101 de *Agrobacterium*

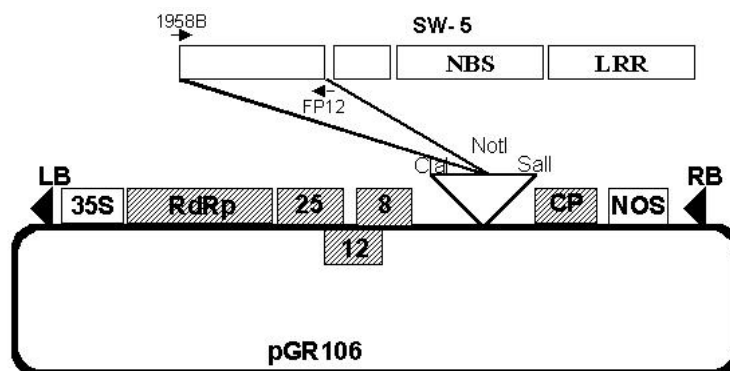


Figura 1 – Representação diagramática da construção PVX::FP12S que contém o fragmento da região 5' de *Sw-5*, clonado no vetor pGR106 na orientação senso. LB, borda esquerda. 35S, promotor do RNA 35S de CaMV. Em hachuras, cDNA do PVX. NOS, terminador do gene *nos*. RB, borda direita. A construção PVX::FP12AS apresenta o inserto derivado de *Sw-5* na orientação inversa.

tumefaciens. A detecção das colônias recombinantes foi realizada por PCR diretamente das colônias utilizando-se o par de oligonucleotídeos 1958B e FP12. A determinação da orientação dos insertos foi realizada por meio de clivagem com *Xho* I. Os clones na orientação senso (PVX::FP12S) e anti-senso (PVX::FP12AS) foram estocados em glicerol 50% estéril a -80°C.

Inoculação das plantas de *Nicotiana benthamiana* com clones de PVX

As inoculações dos clones de *A. tumefaciens* contendo o vetor viral PVX com o fragmento 5' do gene *Sw-5*, foram realizadas pelo “método do palito” (<http://www.Jic.bbsrc.ac.uk/Sainsbury-Lab/david-baulcombe/Services/vigsprotocol.htm>). Os clones da agrobactéria repicados em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) e os antibióticos canamicina (50 µg/mL) e tetraciclina (5 µg/mL) foram crescidos a 28°C por dois a três dias. Colônias bem desenvolvidas foram introduzidas no pecíolo e ao longo da nervura principal das folhas inferiores com auxílio de um palito de dente.

Cinco plantas de cada genótipo (não-transformadas e linhagem B5-5) foram inoculadas com cada clone: PVX selvagem, PVX::FP12S e PVX::FP12AS. As inoculações com tospovírus foram realizadas 15 dias após a inoculação de PVX, quando os sintomas sistêmicos induzidos por este vírus já eram evidentes. Como controle, um grupo de plantas foi inoculado apenas com tospovírus.

Após a inoculação com tospovírus, as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação e avaliadas por um período de 20 dias quanto ao desenvolvimento de sintomas locais e sistêmicos. Foram contabilizadas a incidência de plantas com infecção sistêmica, bem como o total de brotações laterais por planta com sintomas de tospovírus.

Northern blot

Aos 15 dias após a agroinoculação, folhas de plantas de *N. benthamiana* não-transformadas e da linhagem B5-5, foram coletadas para extração do RNA. As folhas foram retiradas da região superior das plantas e exibiam sintomas de infecção sistêmica de PVX. Folhas de plantas não-agroinoculadas e, portanto assintomáticas, também foram coletadas.

A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Longemann et al. (1987), utilizando-se tampão guanidina (hidroclorato de guanidina 8M, ácido 4-morfolino-etano-sulfônico (MES) 20 mM, EDTA 20 mM e mercaptoetanol 50 mM, pH 7,0).

Dez microgramas de RNA total de cada amostra foram submetidos a eletroforese em gel desnaturante (ácido 3-[N-morfolino]propano-sulfônico (MOPS) 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, brometo de etídeo a 100 mg/l, formaldeído 221,4 mM e agarose 1,2% p/v) e tampão de corrida composto por ácido 3-[N-morfolino]propano-sulfônico (MOPS) 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 e formaldeído 221,4 mM.

Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado duas vezes sob agitação por 15 min com água autoclavada e durante 15 min em solução de SSC 10× (citrato de sódio 0,15 M e cloreto de sódio 1,5 M). O RNA foi transferido para membrana de náilon (Hybond N⁺, Amersham Biosciences) por capilaridade, em solução de SSC 10×. Após a transferência, o RNA foi fixado com NaOH 0,4 N e a membrana, lavada em SSC 2×. A membrana foi pré-hibridizada a 68°C durante uma noite, em solução contendo tampão de Denhardt (SSC 5×, solução de Denhardt 5×, SDS 0,5% p/v) adicionado de 200 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. Após a pré-hibridização, foram adicionados 150 ng de sonda (fragmento de 1.125 pb correspondente à região 5' de *Sw-5*) marcada com [α -³²P]-dCTP (3.000 Ci/mmol) pelo método de *random priming*, utilizando-se o kit "PCR-Select Differential Screening"

(Clontech), de acordo com as instruções do fabricante. Após hibridização a 68°C por 24 h, a membrana foi lavada a 65°C durante 20 min em SSC 2× e SDS 0,1% (p/v), em seguida durante 20 min em SSC 1× e SDS 0,1% (p/v) e por fim, durante 20 min em SSC 0,5× e SDS 0,1% (p/v). Após secagem ao ambiente, a membrana foi transferida para um cassete com intensificador contendo filme Kodak X-Omat AR5 e mantida durante 3 dias a -80°C.

RESULTADOS

Avaliação da resistência a tospovírus em plantas da linhagem B5-5 inoculadas com os clones recombinantes PVX::FP12S e PVX::FP12AS

Quinze dias após a agroinoculação, foram observados sintomas sistêmicos típicos da infecção por PVX. As plantas inoculadas com os clones recombinantes PVX::FP12S e PVX::FP12AS apresentaram mosaico semelhante ao observado para PVX selvagem. Ao longo dos 15 dias subsequentes à inoculação com tospovírus, foram observadas diferenças entre os tratamentos quanto à resistência à infecção sistêmica destes vírus. Plantas da linhagem B5-5 (transformadas com *Sw-5*) inoculadas apenas com tospovírus apresentaram reações locais necróticas e nenhum sinal de infecção sistêmica (Figura 2A). As plantas previamente inoculadas com PVX selvagem exibiram reações locais necróticas e mosaico sistêmico, sintoma típico de infecção por PVX (Figura 2B). As plantas agroinoculadas com os clones PVX::FP12S e PVX::FP12AS também exibiram reações locais necróticas, contudo, além do mosaico típico de PVX, as folhas não-inoculadas apresentaram necrose severa (Figura 2C e D). Esta necrose, observada no ápice da planta e nas brotações laterais, inicialmente acompanhava as nervuras, atingindo posteriormente todo o limbo foliar. Por vezes, porém, lesões isoladas apareceram nas folhas antes que os sintomas associados ao sistema vascular se tornassem evidentes. Pecíolos e hastes também necrosaram, levando à morte da planta. A longo dos 15 dias após a inoculação, 100% das plantas pré-inoculadas com o clone PVX::FP12S apresentaram necrose sistêmica sendo, em geral, observados sintomas nas diversas brotações laterais das plantas (Figura 3A e B). A repetição dos ensaios indicou que o efeito dos clones recombinantes PVX::FP12S e PVX::FP12AS, na incidência de necrose sistêmica induzida por tospovírus, foi semelhante.

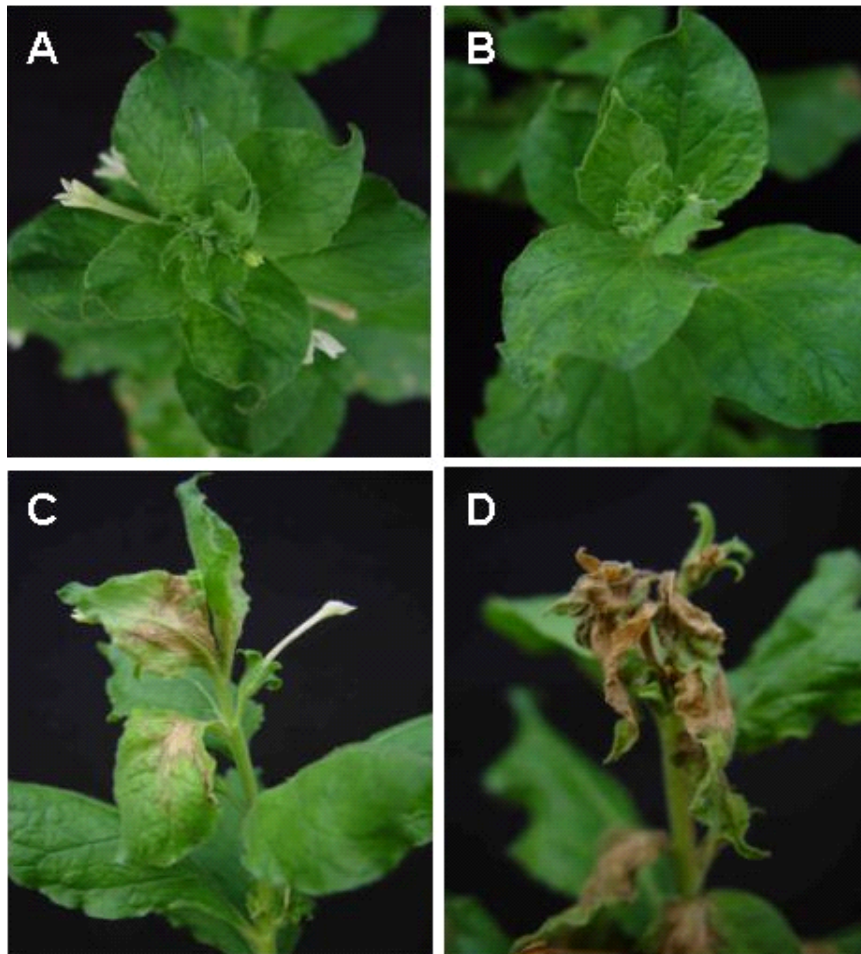


Figura 2 – Sintomas sistêmicos observados em folhas de plantas de *Nicotiana benthamiana* da linhagem B5-5 inoculadas com tospovírus, 15 dias após a agroinoculação com diferentes clones do vetor viral PVX. A) Ausência de sintomas sistêmicos em planta inoculada apenas com tospovírus. B) Mosaico em planta agroinoculada com o vetor PVX selvagem. C) Necrose sistêmica devida à infecção por tospovírus em planta agroinoculada com PVX::FP12AS. D) Necrose sistêmica induzida por tospovírus em planta agroinoculada com PVX::FP12S.

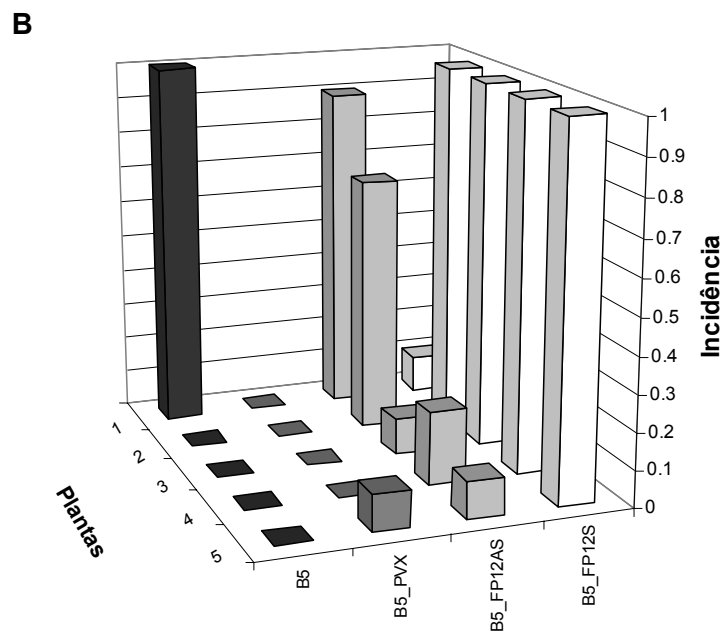
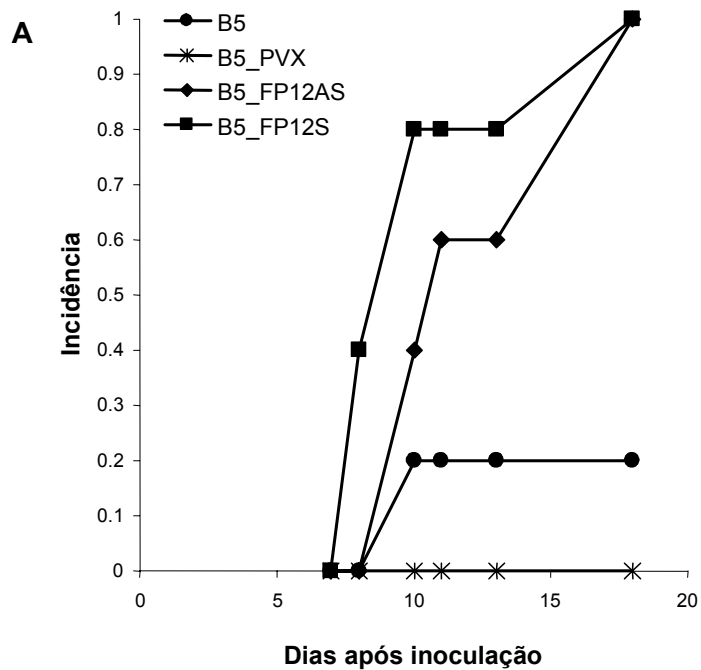


Figura 3 – Incidência de necrose sistêmica induzida por tospovírus em plantas de *Nicotiana benthamiana* da linhagem B5-5, agroinoculadas com vetor viral PVX contendo a região 5' de *Sw-5*. A) Incidência de plantas com necrose sistêmica verificada em dias após a inoculação com tospovírus. B) Incidência de necrose sistêmica em brotações laterais por planta, 15 dias após a inoculação com tospovírus.

Lesões cloróticas, típicos sintomas de tospovírus, foram observadas nas folhas inoculadas das planta não-transformadas. A presença do PVX agravou os sintomas sistêmicos nestas plantas. Enquanto que as plantas inoculadas apenas com tospovírus exibiram sintomas de natureza clorótica, as plantas previamente agroinoculadas com PVX selvagem, PVX::FP12S e PVX::FP12AS, apresentaram necrose em alguns pontos do limbo foliar.

Deteção dos RNAs virais recombinantes em tecidos de *Nicotiana benthamiana* por análise de *Northern blot*

A partir do RNA total extraído de folhas sintomáticas de plantas de *N. benthamiana* não-transformadas e de plantas da linhagem B5-5 agroinoculadas com clones PVX, por análise de *Northern blot*, utilizando como sonda o fragmento de 1125 pb da região 5' de *Sw-5*, foi possível detectar os RNAs virais recombinantes. O mRNA transcrito a partir do transgene presente em plantas da linhagem B5-5 não foi visualizado, possivelmente, devido aos baixos níveis de mRNA presentes na célula. Os RNAs virais recombinantes dos clones PVX::FP12S e PVX::FP12AS foram igualmente detectados em plantas não-transformadas e em plantas da linhagem B5-5 (Figura 4).

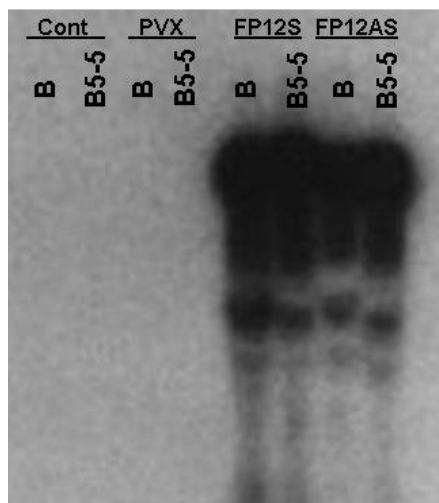


Figura 4 – Detecção dos RNAs virais recombinantes em tecidos de *Nicotiana benthamiana* por análise de *Northern blot*, utilizando como sonda o fragmento de 1.125 pb da região 5' de *Sw-5*. Designações sobre a barra acima de cada linha da membrana correspondem ao clone PVX agroinoculado: PVX - PVX selvagem, FP12S - PVX::FP12S, FP12AS - PVX::FP12AS, Cont - controle composto por plantas não-agroinoculadas. Designações abaixo da barra correspondem à planta da qual o RNA foi extraído: B - Planta de *N. benthamiana* não-transformada; B5-5 - Planta da linhagem de *N. benthamiana* transformada com o gene *Sw-5*.

DISCUSSÃO

Lesões necróticas localizadas no sítio primário de infecção e contenção da infecção sistêmica são características da resistência conferida por *Sw-5* a tospovírus. Fatores do ambiente, do patógeno e do próprio hospedeiro afetam o fenótipo da resistência. Por exemplo, tomateiros com *Sw-5*, normalmente resistentes à infecção por tospovírus, quando inoculados com determinados isolados virais, podem exibir, além das reações locais, severos sintomas sistêmicos. Esta incapacidade de *Sw-5* em conferir resistência à infecção por tospovírus é favorecida por temperaturas elevadas e, ou, heterozigose do loco. A infecção sistêmica de um hospedeiro que contém genes capazes de ativar a resposta de hipersensibilidade é denominada necrose sistêmica e representa um ponto intermediário entre dois extremos: um, a ativação rápida e eficaz de mecanismos de defesa que conduzem à contenção do patógeno, e o outro, a não-ativação de respostas de defesa.

A co-expressão, via vetor PVX, da região 5' de *Sw-5* em plantas da linhagem B5-5 de *Nicotiana benthamiana* transformada com este gene, afetou a resistência destas plantas a tospovírus. Este efeito foi apenas parcial, pois foi observada necrose sistêmica dos tecidos, indicando que os mecanismos de defesa foram ativados, porém em intensidade e, ou, tempo insuficientes para conter a infecção por tospovírus. Este efeito não se deve simplesmente à presença do vírus PVX, pois a co-infecção por PVX selvagem e tospovírus não permitiu a infecção sistêmica deste último. Casos de sinergismo entre vírus de planta são conhecidos. Muitas vezes, a presença de um vírus permite que outro vírus infecte determinadas plantas, ou que o faça com maior eficiência. Nestes casos, porém, um dos vírus normalmente apresenta proteínas capazes de suprimir silenciamento gênico, um mecanismo de defesa de plantas a vírus (Vance e Vaucheret, 2001). O outro vírus, que não apresenta proteínas com tal atividade, aproveita-se, então, de um ambiente celular em que a resistência foi desativada (Pruss et al., 1997). PVX, porém, é considerado um fraco inibidor de silenciamento gênico (Brigneti et al., 1998), sendo pouco provável que favoreça a infecção por tospovírus. Aliás, o contrário deve ocorrer, uma vez que os tospovírus contêm uma proteína (NSs) que é capaz de suprimir o silenciamento gênico (Takeda et al., 2002). Assim, a interferência na resistência a tospovírus em plantas da linhagem B5-5 pelos clones recombinantes PVX::FP12S e PVX::FP12AS, se deve a presença do fragmento 5' de *Sw-5*.

O efeito do clone PVX::FP12S na resistência mediada por *Sw-5* poderia ser em nível de proteína, uma vez que a seqüência da região 5' de *Sw-5* inserida no vetor PVX contém o códon de iniciação. A dominância negativa, resultado da alteração das interações intramoleculares que regulam o funcionamento das proteínas de resistência, ou do comprometimento da interação destas com os demais componentes das vias de transdução de sinais, já foi verificada para outros genes de resistência. A co-expressão do gene *N* com construções contendo deleções ou mutações deste gene conduz à necrose sistêmica em tabaco (Dinesh-Kumar et al., 2000). A co-expressão da região 5' do gene *Mi-1* pode suprimir a letalidade de algumas quimeras formadas entre duas cópias parálogas deste gene (Hwang et al., 2000). Mutações de ponto no domínio LRR do gene *Rps5* comprometem a função de outros genes de resistência (Warren et al., 1998). No entanto, como a interferência na resistência foi observada tanto em plantas inoculadas com PVX::FP12S (inserto de *Sw-5* na orientação senso) como em plantas inoculadas com PVX::FP12AS (inserto de *Sw-5* na orientação anti-senso, portanto sem

a produção de um peptídeo Sw-5 funcional), é possível que algum mecanismo em nível de RNA esteja envolvido. O silenciamento de genes de resistência já foi verificado. Por meio de VIGS, Liu et al. (2002a) foram capazes de silenciar o gene *N* em plantas de *N. benthamiana*, permitindo, assim, a infecção destas plantas por TMV. Análise de RT-PCR semiquantitativa indicou uma redução de mais de 88% nos níveis de transcritos do gene. O VIGS também tem sido uma ferramenta importante para a análise de genes envolvidos no processo de defesa, tanto aqueles envolvidos na transdução de sinais como aqueles que atuam diretamente sobre o patógeno (Liu et al., 2002a e 2002b). Em geral, nestes trabalhos, verifica-se que o silenciamento é parcial. Sendo assim, é possível que no presente trabalho tenha ocorrido silenciamento parcial do gene *Sw-5*. Uma queda nos níveis de transcritos deste gene levaria a um atraso na ativação das respostas de defesa, o que permitiria a infecção sistêmica por tospovírus. Isto estaria de acordo com as observações sobre a importância dos níveis de expressão gênica na resistência neste sistema. Paradoxalmente, é possível que a própria infecção por tospovírus, devido à presença da proteína NSs, interfira no estabelecimento do silenciamento gênico. Assim, o vírus desligaria o silenciamento do gene de resistência fazendo com que este voltasse a disparar respostas de defesa.

Contudo, por meio de análise de *Northern blot*, não foi verificada alteração nos níveis dos RNAs virais contendo o fragmento 5' do gene *Sw-5*. Pode ser que nas folhas coletadas para análise, o silenciamento gênico ainda não houvesse sido desencadeado. Alternativamente, caso o silenciamento gênico estivesse apenas parcialmente estabelecido, é possível que a análise de *Northern* não tenha sido sensível o suficiente para detectar pequenas variações nos níveis de RNA. Análises mais sensíveis, como a RT-PCR semiquantitativa ou a demonstração da ativação do silenciamento gênico por meio de marcas moleculares deste mecanismo, como a detecção de siRNAs correspondentes ao gene *Sw-5*, poderiam comprovar que o silenciamento gênico e a redução dos níveis de mRNA de *Sw-5* são a causa da interferência na resistência.

LITERATURA CITADA

- BENDAHMANE, A., KANYUKA, K., BAULCOMBE, D.C. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. **Plant Cell**, v.11, p.781-791, 1999.
- BOITEUX, L.S., GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, v.71, p.151-154, 1993.
- BRIGNETI, G., VOINNET, O., LI, L-H., DING, S-W., BAULCOMBE, D.C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **The EMBO Journal**, v.17, p.6739-6746, 1998.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., TANKSLEY, S.D., FRARY, A., FRARY, A., OTONI, W.C., CHEAVEGATTI, A. Positional cloning, molecular characterization and heterologous expression of the tospovirus resistance gene *Sw-5*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998. Edinburgh, Scotland. **Proceedings...** Edinburgh, 1998, v.3. p.54.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., FRARY, A., 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**, v.13, p.1130-1138, 2000.
- COLLMER, C.W., MARSTON, M.F., TAYLOR, J.C., JAHN, M. The *I* gene of bean: a dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance or spreading vascular necrosis in response to the potyvirus *Bean common mosaic virus*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.13, p.1266-1270, 2000.
- DINESH-KUMAR, S.P., BAKER, B. Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: Their possible role in *Tobacco mosaic virus* resistance. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.97, p.1908-1913, 2000.
- DINESH-KUMAR, S.P., THAM, W.H., BAKER, B.J. Structure-function analysis of the *Tobacco mosaic virus* resistance gene *N*. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.97, p.14789-14794, 2000.
- GRANT, M.R., GODIARD, L., STRAUBE, E., ASHFIELD, T., LEWALD J., SATTTLER, A., INNES, R.W., DANGL, J.L. Structure of the Arabidopsis *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. **Science**, v. 269, p.843-84, 1995.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.
- HUTCHESON, S.W. Current concepts of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.59-90, 1998.

- HWANG, C.-F., BHAKTA, A.V., TRUESDELL, G.M., WACLAWA, M.P., WILLIAMSON, V.M. Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. **Plant Cell**, v.12, p.1319-1329, 2000.
- LAU, D. **Análise de fatores que influenciam a resistência a tospovírus conferida pelo gene *Sw-5* em tomateiro e tabaco.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 84p. Dissertação (Tese de Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LIU, Y., SCHIFF, M., MARATHE, R., DINESH-KUMAR, S.P. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIMI* like genes are required for *N*-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. **Plant Journal**, v.30, p. 415-429, 2002a.
- LIU, Y., SCHIFF, M., SERINO, G., DENG, X-W., DINESH-KUMAR, S.P. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. **Plant Cell**, v.30, p. 1483-1496, 2002b.
- LONGEMANN, J., SCHELL, J. WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v.163, p.16-20, 1987.
- MILLIGAN, S. B., BODEAU, J., YAGHOUBI, J., KALOSHIAN, I., ZABEL, P., Williamson, V.M. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **Plant Cell**, v.10, p.1307-1319, 1998.
- OLIVEIRA, J.C., LAU, D., YAMAZAKI, E., LIMA, G.S.A., BROMMONSCHENKEL, S.H. A resistência conferida pelo gene *Sw-5* em sistema heterólogo é influenciada pelo isolado viral e número de cópias do transgene. In: XXXIV CONGRESSO NACIONAL DE FITOPATOLOGIA, 2001, São Pedro. **Resumos...**Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001, p.528.
- ORI, N., ESHED, Y., PARAN, I., PRESTING, G., AVIV, D., TANKSLEY, S., ZAMIR, D., FLUHR, R. The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. **Plant Cell**, v.9, p.521-532, 1997.
- PRUSS, G., GE, X., SHI, X.M., CARRINGTON, J.C., VANCE, V.B. Plant viral synergism the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, v.9, p.859-868, 1997.
- ROSELLÓ, S., DIEZ, M.J., LACASA, A., JORDÁ, C., NUEZ, F. Testing resistance to TSWV introgressed from *Lycopersicon peruvianum* by artificial transmission techniques. **Euphytica**, v.67, p.93-98, 1997.
- RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A. STEINER, H., HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.

- SALMERON, J.M., OLDROYD, G.E.D., ROMMENS, C.M.T., SCOFIELD, S.R., KIM, H. -S., LAVELLE, D.T., DAHLBECK, D., STASKAWICZ, B.J. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. **Cell**, v.86, p.123-133, 1996.
- STEVENS, M.R., SCOTT, S.J., GERGERICH, R.C. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersion peruvianum* MILL. **Euphytica**, v.59, p.9-17, 1992.
- 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**, v.532, p.75-79, 2002.
- VANCE, V., VAUCHERET, H. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. **Science**, v.292, p.2277-2280, 2001.
- VIDAL, S., CABRERA, H., ANDERSSON, R.A., FREDRIKSSON, A., VALKONEN, J.P.T. Potato gene *Y-1* is an *N* gene homolog that confers cell death upon infection with *Potato virus Y*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.717-727, 2002.
- WARREN, R.F., HENK, A., MOWERY, P., HOLUB, E., INNES, R.W. A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. **Plant Cell**, v.10. p.1439-1452, 1998.
- YAMAZAKI, E. **Resistência de tabaco e alface transformados com o gene *Sw-5*, sob o controle do promotor 35S, a três espécies de tospovírus**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 49p. Dissertação (Tese de Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- YU, I.C., PARKER, J., BENT, A.F. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.93, p.7819-7824, 1998.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE FUNCIONAL EM TOMATEIRO E TABACO DE SEQÜÊNCIAS HOMÓLOGAS AO GENE *Sw-5*, CLONADAS POR MEIO DE PCR

Douglas Lau¹, Edgar Paulino de Sousa¹, Lúcio Mauro Guimarães¹, Gaus Silvestre de Andrade Lima², Elene Yamazaki Lau¹, Sérgio Hermínio Brommonschenkel¹.

¹Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, CEP 36570-000, Viçosa, MG; Brasil; ² Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA. Av. Gal. San Martin, 1371, Bongi, Recife, PE, CEP 50761-000 (Autor para correspondência: shbromo@ufv.br).

RESUMO

O gene *Sw-5* pertence a uma família multigênica, com membros dispersos nos cromossomos 9 e 12 do tomateiro. Utilizando-se oligonucleotídeos específicos é possível, a partir de plantas resistentes ou suscetíveis a tospovírus pertencentes a diferentes espécies de tomateiro (*Lycopersicon chilense*, *L. peruvianum*, *L. esculentum*), amplificar, por meio de PCR, seqüências homólogas ao gene *Sw-5*. As seqüências amplificadas podem corresponder a genes situados em diferentes regiões genômicas, genes situados em locos próximos em uma mesma região genômica ou, ainda, a alelos do gene *Sw-5*. Assim, análises genéticas e funcionais são necessárias para confirmar que a seqüência amplificada corresponde, de fato, ao gene de resistência. Neste trabalho, uma seqüência homóloga a *Sw-5*, oriunda do acesso LA371-20 de *L. peruvianum*, foi clonada, sequenciada e sua funcionalidade, bem como a de outros três homólogos (Lima, 2001), avaliada em plantas transgênicas de tomate e tabaco. Construções contendo a ORF destes homólogos, sob controle do promotor 35S e região terminadora da transcrição do gene *Nos*, foram utilizadas nas transformações via *Agrobacterium tumefaciens*. Plantas de progênes oriundas da autofecundação dos transformantes primários foram suscetíveis ao vírus, indicando que as construções utilizadas nas transformações não são funcionais. A análise de segregação de um marcador CAPS, estabelecido a partir da seqüência amplificada de LA371-20 em indivíduos de uma população RC₁F₂ proveniente deste acesso, indicou que o homólogo clonado localiza-se no loco *Sw-5* ou em loco proximamente ligado e que co-segrega com a resistência a tospovírus. Assim, é possível que outro homólogo, também amplificado a partir deste acesso, possa contribuir ou ser responsável pela resistência.

Palavras-chave: resistência a tospovírus, genes parálogos, expressão heteróloga.

INTRODUÇÃO

Sw-5 é o gene mais utilizado em programas de melhoramento visando a obtenção de cultivares de tomate resistentes a tospovírus. Este gene, originário do tomateiro selvagem *Lycopersicon peruvianum*, confere resistência a várias espécies de tospovírus (Stevens et al., 1992; Boiteux e Giordano, 1993; Boiteux et al., 1993; Brommonschenkel et al., 2000). Originalmente, a resistência conferida por *Sw-5* foi considerada dominante, com penetrância incompleta (Stevens et al., 1992; Boiteux e Giordano, 1993). Posteriormente, foi demonstrado que o gene *Sw-5* pode comportar-se como dominante ou semidominante, dependendo do isolado viral (Lau, 2001). Embora as análises genéticas indiquem que um único fator é responsável pela resistência de amplo espectro derivada de *L. peruvianum*, é possível que esta seja decorrente da ação de vários genes situados em locos próximos, cada um conferindo resistência a uma espécie distinta de tospovírus. O amplo espectro da resistência, observado em plantas de tomate e berinjela transformadas com *Sw-5* (Brommonschenkel et al., 2000; Picoli et al., 1999), corrobora a hipótese de que o gene *Sw-5* é capaz de conferir resistência a várias espécies de tospovírus. A restrição do espectro da resistência em tabaco transformado com este gene, observada por Brommonschenkel et al. (1998), pode ter relação com a menor funcionalidade da proteína *Sw-5* neste hospedeiro uma vez que o espectro da resistência pode ser restituído em plantas com maior número de inserções do transgene (Oliveira et al., 2001; Yamazaki, 2001).

Vários trabalhos relatam novas fontes de resistência a tospovírus em tomateiro, principalmente em acessos das espécies *L. peruvianum*, *L. chilense* e *L. hirsutum* (Paterson et al., 1989; Krishna-Kumar et al., 1993; Roselló et al., 1998; Lima, 2001; Lourenção et al., 2001). Análises genéticas indicam que alguns acessos contêm alelos do gene *Sw-5* (Roselló et al., 2001), enquanto outros apresentam genes distintos (Roselló et al., 1998). Baseando-se no princípio de que a resistência é conferida por genes que apresentam similaridade com *Sw-5*, pode-se empregar a técnica de PCR para isolar os genes responsáveis pela resistência nestes acessos e transferi-los, via transformação genética, para cultivares comerciais. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores para as regiões correspondentes ao início e fim da ORF *Sw-5*, Lima (2001) foi capaz de amplificar homólogos de *Sw-5* presentes em acessos de *L. chilense*, *L. peruvianum*, *L. hirsutum* e *L. esculentum*. Considerando a organização genômica de seqüências homólogas ao gene *Sw-5*, é possível que estas seqüências correspondam a

alelos do loco *Sw-5*, de um loco proximalmente ligado ou localizado em outras regiões genômicas. Utilizando um marcador CAPS localizado próximo ao loco *Sw-5*, Guimarães (2002) demonstrou que a resistência proveniente do acesso LA371-20 de *Lycopersicon peruvianum* co-segrega com o loco *Sw-5*, indicando que esta resistência pode ser devida a um alelo do loco *Sw-5* ou de um loco próximo a este. A resistência presente neste acesso é devida a um gene dominante que, assim como *Sw-5*, confere resistência de amplo espectro a tospovírus caracterizada pela presença de lesões locais necróticas nas folhas inoculadas.

No presente trabalho, uma seqüência homóloga a *Sw-5*, amplificada a partir do acesso LA371-20 de *Lycopersicon peruvianum*, foi clonada e sequenciada. Um marcador CAPS estabelecido a partir da seqüência homóloga, indicou que esta seqüência pertence à região genômica do tomateiro próxima ao loco *Sw-5* e co-segrega com a resistência a tospovírus. Contudo, como mais de um produto é amplificado a partir desta região, é possível que existam genes homólogos ligados e análises são necessárias para inferir qual deles ou se ambos são responsáveis pela resistência. A funcionalidade deste homólogo e de outros três clonados por Lima (2001) foi avaliada em plantas transgênicas de tomateiro e tabaco.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados e inoculação de tospovírus

Os isolados de tospovírus Cb e AL (*Groundnut ringspot virus*), utilizados neste trabalho, são originários do Brasil e fazem parte da coleção do Laboratório de Genética da Interação-Planta Patógeno (BIOAGRO/UFV), sendo sua identificação baseada no seqüenciamento do gene *N* (nucleocapsídeo). O número de acesso da seqüência do nucleocapsídeo dos isolados é dado a seguir: Cb (AF251271) e AL (AF513219).

Os tospovírus foram inoculados via extrato vegetal tamponado. O inóculo original, mantido a -80°C , foi previamente multiplicado em *Nicotiana tabacum* 'Havana 425'. Folhas infectadas foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,01 M e carborundum 600-mesh. O extrato foi esfregado sobre folhas de tomateiro e tabaco com auxílio de gaze.

Clonagem e seqüenciamento de um homólogo de *Sw-5* proveniente do acesso LA371-20 de *Lycopersicon peruvianum*

A partir do DNA extraído de tomateiro que contém, em homozigose, a região genômica do loco *Sw-5* originada do acesso LA371-20 (Guimarães, 2002), foi amplificado um fragmento de aproximadamente 3,8 Kb que corresponde a ORF completa do gene *Sw-5*, utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B (5' - GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG-3') e 5750 (5'- GGG CTA GCA AGT CTA GAG TGG C - 3'). O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM-T easy (Promega). A seqüência de nucleotídeos foi determinada em sequenciador automático Perkin-Elmer modelo ABI 3100, utilizando-se o kit "Big Dye v.3.0" (Amersham). A montagem da ORF e tradução da seqüência foram realizadas no programa DNAMAN versão 4.0 (Lynnon Biosoft). O alinhamento da proteína, deduzida a partir desta seqüência com a proteína codificada pelo gene *Sw-5* (Brommonschenkel et al., 2000) e com proteínas de outros homólogos deste gene (Lima, 2001), foi realizado utilizando-se o programa ClustalW versão 1.82.

Transferência de homólogos de *Sw-5* para o vetor binário pBI121

O homólogo obtido a partir de LA371-20, bem como outros três clonados por Lima (2001) (Tabela 1), foram transferidos para o vetor pBI121 (Clontech). Estes homólogos foram selecionados por apresentarem a ORF completa, semelhante à ORF *Sw-5*, sem interrupções prematuras devidas a códons de terminação da tradução. Além disso, segundo avaliações de Lima (2001), estes homólogos foram amplificados a partir de plantas resistentes a tospovírus.

Tabela 1 – Clones contendo homólogos do gene *Sw-5* obtidos por Lima (2001), selecionados para análise funcional em tomateiro e tabaco.

Clone	Acesso	Espécie
pGPP32	LA 2753-11	<i>L. chilense</i>
pGPP60	PI 126944-6	<i>L. peruvianum</i>
pGPP65	PI 126928-2	<i>L. peruvianum</i>

Para a clonagem dos homólogos no vetor binário pBI121 (Clontech), foram inseridos, por meio da técnica de PCR, sítios para a enzima de restrição *Sma*I, utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B (5'-GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG-3') e 5750Sma (5'- GGG CTA GCC CGG GTT GAG TGG C-3'), desenhados para este fim. Os plasmídeos recombinantes dos clones contendo os homólogos, foram extraídos pelo método da lise alcalina (Sambrook et al., 1989). O DNA plasmidial foi utilizado como molde nas reações de PCR, com a seguinte composição: 50 ng de plasmídeo, 10 µL de tampão 5X (concentração final de cloreto de magnésio para 2 mM), 4 µL da mistura de desoxinucleotídeos 0,01 M, 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 µL (2 a 5 unidades) do sistema enzimático *Elongase*TM (Gibco-BRL) e água destilada estéril suficiente para atingir volume final de 50 µL. As reações de PCR foram compostas de 35 ciclos a 94°C durante 30 s (desnaturação), 56°C por 1 min (anelamento), 68°C por 5 min (extensão), seguidos por uma extensão final a 68°C por 5 min.

Os fragmentos, amplificados por PCR, foram re-clonados no vetor pGEM-T easy (Promega). Os quatro novos clones obtidos, que correspondem a ORF dos homólogos flanqueadas por sítios para a enzima de restrição *Sma*I, foram submetidos à clivagem com esta enzima e os insertos liberados, ligados no sítio *Sma*I do vetor binário pBI121. Desta forma a ORF destes homólogos ficou sob controle do promotor do RNA 35S do CaMV e região terminadora da transcrição do gene *Nos* de *A. tumefaciens*. A determinação da orientação dos insertos foi realizada por meio de clivagem com a enzima *Bam*HI. Os plasmídeos recombinantes foram transferidos por eletroporação para a estirpe LBA4404 de *A. tumefaciens*. A detecção das colônias recombinantes foi realizada por PCR diretamente das colônias utilizando-se o par de oligonucleotídeos 1958B (5'-GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG-3') e FP12 (5'-AGG ATT TGT AGT ACG TCT CAA CTT G-3') que pareiam na região 5' do gene *Sw-5*. Plantas de tabaco e tomate foram transformadas com estes clones, empregando-se os protocolos propostos por Horsch et al. (1985) e Frary e Earle (1996), respectivamente.

Avaliação da resistência a tospovírus

A avaliação da funcionalidade dos quatro homólogos do gene *Sw-5*, foi realizada por meio da inoculação de tospovírus em folhas destacadas a partir dos transformantes primários e por meio da inoculação de plantas de progênes oriundas da autofecundação dos transformantes primários.

Folhas destacadas retiradas dos transformantes primários de tomateiro e tabaco foram inoculadas com tospovírus. As folhas foram acondicionadas em gerbox contendo papel umedecido e mantidas em câmara de temperatura controlada a 22°C. As lesões locais foram comparadas com as lesões observadas em folhas de plantas não-transformadas (controles negativos), de tabaco 16I-2 (linhagem transformada como o clone cosmídeo TC134-8) e tomateiro transformado com o clone pGPP63, os quais contêm o gene *Sw-5* clonado a partir da linhagem SW99-1 de tomateiro por Brommonschenkel et al. (2000).

Plantas de progênes oriundas da autofecundação dos transformantes primários foram inoculadas com tospovírus e avaliadas quanto ao tipo de lesão formada nas folhas inoculadas e capacidade de contenção da infecção sistêmica. Assim como para os ensaios com folha destacada, plantas não-transformadas foram utilizadas como controles negativos e plantas de tabaco 16I-2, tomateiro transformado com o clone pGPP63 e plantas da linhagem SW99-1, foram utilizadas como controles positivos. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação e avaliadas por um período de 10 dias quanto ao desenvolvimento de sintomas locais e sistêmicos.

Determinação da presença do transgene por meio de PCR

A presença das seqüências transgênicas em plantas de tomate e tabaco foi determinada, via PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B e FP12. O DNA das plantas de tabaco e tomate foi extraído de acordo com protocolo de Fulton et al. (1995). A reação de PCR consistiu em 100-200 ng de DNA genômico, 2,5 µL do tampão de reação 10X (Tris-HCl 200 mM pH8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µL da mistura de deoxinucleotídeos (0,01 M de cada dNTP), 0,5 µL do oligonucleotídeo 1958B (10 µM) (5'- GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG -3'), 0,5 µL do oligonucleotídeo FP12 (10 µM) (5'- AGG ATT TGT AGT ACG TCT CAA CTT G -3'), 2 a 5 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase e água estéril (Milli-Q) suficiente para atingir um volume final de 25 µL. Após desnaturação inicial a 94°C por 3 min, a amplificação constituiu de 40 ciclos de desnaturação por 30 s a 94°C, anelamento por 1 min a 52°C e extensão a 72°C por 2 minutos. Após os 40 ciclos, foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Nas condições de PCR utilizadas, em tabaco somente as plantas transgênicas apresentam amplificação do fragmento. Em

tomateiro, no entanto, devido à presença de seqüências homólogas à seqüência do gene em análise, foi necessário clivar os produtos de PCR para, por meio do padrão de restrição específico para cada homólogo, determinar se as plantas estavam transformadas.

RESULTADOS

Seqüenciamento de um homólogo do gene *Sw-5* e análise da região genômica do acesso LA371-20 que confere resistência a tospovírus

Por meio de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene *Sw-5* e como molde, o DNA extraído de uma planta de tomate (denominada EP1) que contém, em homozigose, a região genômica do loco *Sw-5* originada do acesso LA371-20 de *Lycopersicon peruvianum* (Guimarães, 2002), foi amplificado um fragmento de aproximadamente 3,8 Kb. Este contém uma ORF que codifica uma proteína de 1.244 aminoácidos que apresenta 93,6% de identidade com a proteína codificada pelo gene *Sw-5* clonado por Brommonschenkel et al. (2000), e 92,2% de identidade com a proteína codificada pelo homólogo obtido por Lima (2001), a partir deste mesmo acesso. Na região N-terminal, bem como na região carboxi-terminal (onde se localizam as repetições ricas em leucina), concentra-se a maior parte da variação entre estas proteínas. O domínio NBS (*nucleotide binding site*) é a região menos variável, apresentando conservados os motivos cinase 1a, cinase 2 e cinase 3a, típicos das proteínas de resistência (Figura 1).

A análise exploratória da presença e variabilidade de seqüências homólogas ao gene *Sw-5* em vários acessos de tomateiro selvagem foi realizada, por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos FP12 e 1958B que pareiam na região 5' do gene *Sw-5*. Obteve-se, em todos os acessos, um produto amplificado de 1.125 pb. Clivando-se este produto com a enzima de restrição *RsaI*, verificou-se que o somatório do tamanho das bandas obtidas superou os 1125 pb, portanto, o produto amplificado corresponde a uma mistura de fragmentos com seqüências distintas (Figura 2). Em alguns acessos, até quatro produtos distintos puderam ser observados, o que corresponderia, no mínimo, a amplificação a partir de dois locos todos em heterozigose.


```

SW99      MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDLDILRIEEMVLRVFRFTKYHDVLLPDSLVELTK 60
MM        MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDFDILRIGELEMVLRVFRFTKYHDVLLPDSLVELTK 60
LA371-11 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDLDILRIEKLEMVLRVFRFTKYNDVLLPDSLVELAK 60
LA371-20  MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLDFGILQIEEVEMVLRVFRFTKYNDVLLPDSLVELTK 60
*****.* :.*.* :.*.* :.*.* :.*.* :.*.* :.*.* :.*.* :.*.* :.*.*

SW99      RAKLTGEILHRVLGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMD 120
MM        MAKLTGEILHRVLGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSRNYELNDFDLSKYMD 120
LA371-11  RAKLIGEILHLLLGRIPHKCKTNLNIERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLPKYMD 120
LA371-20  RAKLSGEILHRVLGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMD 120
      *** ***** :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

SW99      CLENFLNDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
MM        CLENFLNDVLMFLQKGRSCHSRKRLAKHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
LA371-11  LLENFLNDLLMMFLQKDRFFHSREQLAKHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
LA371-20  CLENFLNDLLMMFLYEGRSCHSIKQLAIHRSIKELEIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
      *****.* :.* * * .:* *****.* :*****.* :*****.*

SW99      KQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSSKPPYLLSLIVLVELEMKKIF 240
MM        KQECLEIRIQFMTNTVGQYCVAVLDYVTEGKLNENDNFSSKPPYLLSLIVLVELEMKKIF 240
LA371-11  KQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSSKPPYLLSLIVLVELEMKKIF 240
LA371-20  KQECLETRIQFMTNTVGQYCVAVLDYVAECELNDENDNFSSKPPYLLSLIVLVELEMKKIF 240
      *****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

SW99      HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLLHLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
MM        HGEVKASKFTRSKTFKDKKLPKGFSSHLLHLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
LA371-11  HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLLHLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
LA371-20  HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLLHLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
      *****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

SW99      VFLDADVSNHVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
MM        VFLDADVSNHVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
LA371-11  VFLDADVSNHVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
LA371-20  VFLDADVSNHVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
      *****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

SW99      KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNEMSTSKSGLGLMKPLLGNL 420
MM        KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLDSLLRKLNEMSTSKSGLGLMKPLLGNL 420
LA371-11  KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLDSLLRKLNEMSTSKSGLGLMKPLLGNL 420
LA371-20  KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFLTFFGLSFLDSLLRKLNEMSTSKSGLGLMKPLLGNL 420
      *****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

SW99      EKELSSLTSILEKELSSIFRDVVHHEHNI PKDLQRRRTINLSYEA EVAIDS ILAQYNAFLH 480
MM        EKELSSLTSILEKELSSIFRDVVHHDHNI PKDLQRRRTINLACEA EVAIDS ILAQYNVFLH 480
LA371-11  EKELSSLTSILEKELSSIFRDVVHHEHNI PKDLQRRRTINLAYE EVAIDS ILAQYNAFLH 480
LA371-20  EKELSSLASILEKELSSIFSDVVHHEHSI PKDLQRRRTINLAYE EVAIDS ILAQYNVFLH 480
      *****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

SW99      IFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYVAAPLKHLPDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
MM        IFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYVAAPLKHLPDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
LA371-11  IFCSLPTILKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYVAAPLKHLPDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
LA371-20  IFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWLADIPLNPHYVAAPLKYLPDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
      *****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

      cinase-1a
SW99      AEELIDYLIRGTNELDVVPIVGMGGQKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRR 600
MM        AEELIDYLIRGTNELDVVPIVGMGGQKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRR 600
LA371-11  AEELIDYLIRGTNELDVVPIVGMGGQKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRR 600
LA371-20  AEELIDYLIRGTNELDVVPIVGMGGQKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNQR 600
      *****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

      cinase-2
SW99      ELLQDIFSQVTGSDDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFDDG 660
MM        ELLQDIFSQVTGFNDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFDDG 660
LA371-11  ELLQDIFSQVTGSDDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFDDG 660
LA371-20  ELLQDIFSQVTGFNDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFDDG 660
      *****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.* :*****.*

```

Figura 1 – Alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida a partir do homólogo do gene *Sw-5*, clonado a partir do acesso LA371-20. SW99 – seqüência da proteína codificada pelo gene *Sw-5*, clonado a partir de da linhagem SW99-1 (Brommschenkel et al., 2000); MM - homólogo clonado a partir de *L. esculentum* cv. Moneymaker. LA371-11 - homólogo clonado por Lima (2001). Os motivos cinase-1a, cinase-2 e cinase-3a, estão sublinhados. Os limites do domínio NBS estão demarcados por setas.

cinase-3a

```

SW99      IRSRIVVTTTRLEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV 720
MM        IRSRIVVTTTRLEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV 720
LA371-11 NRSRIVVTTTRLEEVGKQVKYHTDPYSLPFLKTEESCQLLQKKVFQKDDCPPPELQDVSQAV 720
LA371-20  IRSRIVVTTTRLEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV 720
          *****.*****.*****

SW99      AEKCKGLPLVVVLVAGIIKKRKMEEESWVNEVKDALFDYLDSEFEYSLATMQLSFDNLPH 780
MM        AEKCKGLPLVVVLVAGIIKKRKMEEESWVNEVKDALFDYLDSEFEYSLATMQLSFDNLPH 780
LA371-11  AEKCKGLPLVVVLVAGIIKKRKMEEESWVNEVKDALFDYLDSEYEEYSLATMQLSFDNLPH 780
LA371-20  AEKCKGLPLVVVLVAGIIKKRKMEEESWVNEVKDALFDYLDSEFEYSLATMQLSFDNLPH 780
          *****.*****.*****

SW99      CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLDLISSNLVM 840
MM        CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLDLISSNLVM 840
LA371-11  CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEQEAEGYLDLISSNLVM 840
LA371-20  CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLDLISSNLVM 840
          *****.*****

SW99      LSKRITYKGRVKYQCQVHDVVHFCLEKSREAKFMLAVKGYIHFQPSDWKGTTRVFSFSFSEE 900
MM        LSKRITYKGRVKYQCQVHDVVHFCLEKSREAKFMLAVKGYIQFQPLDWKGTTRGGSFSFSEE 900
LA371-11  LSKRITYKGRVKYQCQVHDVVHFCLEKSREAKFMLAVKGLYIHFQPLDLKGTTRVFSFSFSEE 900
LA371-20  LSKRSYKGRVKYQCQVHDVVHFCLEKSREAKFMLAVKGYIQFQPLDWKGTTRVFSFSFSEE 900
          *****.***.***** **.* ** * ** * .*****

SW99      LSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAKSINDIFSCQISELRLLKVLDDLSSYIVVEFLSL 960
MM        LSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAESIDVILFCQISELRLLKVLDDLSSYIVVEFLSL 960
LA371-11  LSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITANRAKSIEDNPSCQISELRLLKVLDDLSSYIVDFLFLSL 960
LA371-20  LSKFSSLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAESIDEILFCQISELRLLKVLDDLSSYIVVEFLSL 960
          *****.*** *****.* *.*: ***** *.***

SW99      ATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPPYDILLPVSFWEMKKLRHAHF 1020
MM        ATFKPLNQLKYLAVQADKFFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPPYDILLPVSFWEMKKLRHAHF 1019
LA371-11  ATFKPLNQLKYLAVQANKFFYFDPGSHLPHIETFIVKNFPYNDIGLPVSFWEMKKLRHAHF 1020
LA371-20  ATFKPLNQLKYLAVEAYKFFYFDPGSHLPHIETFIVKNLPPYDILLPVSFWEMKKLRHAHF 1020
          *****.*.*.***** **.* * *****

SW99      GKAEFDKQGLSEGSSKLENLRILKNIVGFDVRDVLRRCPNLQQLQITYFGNNEEFPFCPK 1080
MM        GKAEFDKQGLSEGSSKLENLRILKNIVQFDRVDVLSRRCPNLQQLQITYFGNNEEFPFCPK 1079
LA371-11  GKAEFDKQGLSEGSSKLENLRILKNIVGFDVRDVLRRCPNLQQLQITYFGNNEEFPFCPK 1080
LA371-20  GKAEFDKQGLFEGSSKLENLRILKNIIGFDGVDVLSRRCPNLQQLKITYFGIDEPEFPTPK 1080
          ***** *****.: ** *****.***** :**** *

SW99      LENLTQLQQLQLSFARPTLSGLQLPSNLNKLVLLEGIHIESVIFPIAGLPSLEYLQLQDV 1140
MM        LENLTQLQQLQLSFARPTLSGLQLPSNLNKLVLLEGIHIESVIFPIAGLPSLEYLRLQDV 1139
LA371-11  LENLTQLQQLQLSSVRPHTLSGLQLPSNLNKLALLEGIHIGSVIFPIAGLPSLEYLQLQDV 1140
LA371-20  FDNLTQLQQLRLSSVPHTLSGLQLPSNLNKLVLLEGIHIESVIFPIAGLPSLEYLQLQDV 1140
          :.*****.:** .*.*****.***** *****.*****:****

SW99      CFPQSEEWCLGDITFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEESFPFLETLVIKKCIDLEEIPLSFA 1200
MM        CFPQSEEWCLGDITFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEESFPFLETLVIKKCGDLEEIPVSFA 1199
LA371-11  CFPQSEEWCLGDITFHKLKLLKLVKLNISRWDASEESFPFLETLVIKKVVDLEEIPLSFA 1200
LA371-20  CFPQSEEWCLGDITFHKLKLLKLVNLRISRWDVSEESFPFLETLVIKRCVQLKEIPLSFA 1200
          *****.*.*****.*****: :*.***:***

SW99      DIPTLEQIKLIGSWKVSLEDSAVRMKEEIKETEGCDRLHLVKQRSD 1246
MM        DIPTLEQIKLVGSKVSLEDSAVRMKEEIIDIEGCDRLHLVKQHS 1245
LA371-11  DIPTLEQIKLIGSWKVSLEDSAVRMKEEIKETEGCDRLHLVKQLSD 1246
LA371-20  DIPTLEQIKLIGYWQVSLEDSAVRMKEEIKEIEGCDRLHLVKQR-- 1244
          *****.* *.*:***** : ***** :.

```

Figura 1, cont.

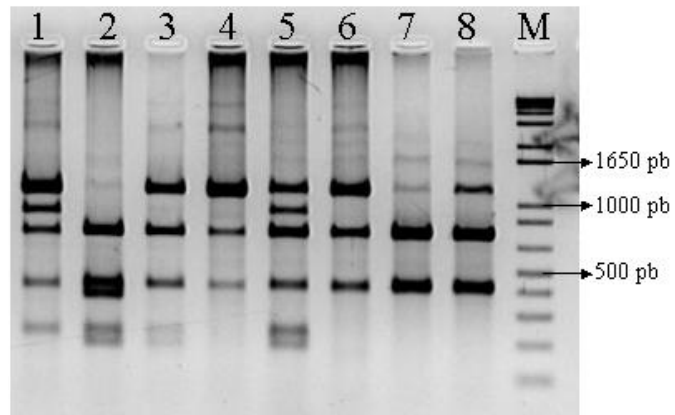


Figura 2 – Padrão de restrição *RsaI* de fragmentos amplificados por PCR a partir de DNA genômico de diferentes acessos de tomateiro, utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B e FP12 que pareiam na região 5' do gene *Sw-5*. M - Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder; 1 - PI126444-3; 2 - PI126944-13; 3 - PI126944-6; 4 - LA2753; 5 - LA444-1; 6 - LA371-20; 7 - SW99-1; 8 - *L. esculentum* cv. Moneymaker.

A partir da planta original do acesso LA371-20, pelo menos dois produtos distintos foram amplificados, os quais poderiam ser provenientes de regiões genômicas distintas ou de uma mesma região. No segundo caso, poderiam ter sido amplificados a partir de locos muito próximos ou, ainda, corresponderem a alelos de um mesmo loco. A presença de ambos os produtos no híbrido formado entre esta planta e o cultivar Moneymaker e nas plantas RC_1F_2 homocigotas para esta região genômica, obtidas após a autofecundação do retrocruzamento entre o híbrido e Moneymaker (Figura 3), sugere que os produtos amplificados sejam oriundos da mesma região, correspondendo a dois locos próximos. Assim, LA371-20 apresentaria dois locos próximos, por exemplo, A e B, que até onde as análises de restrição permitem concluir, estariam em homocigose (Figura 4). A partir do loco A, seria amplificado o produto 1 clivado por *RsaI* (posição 1114) e por *HindIII* (posição 1009) apenas na sua extremidade. A partir do loco B, seria amplificado o produto 2 clivado internamente por *RsaI* (posições 386 e 1114) e apenas na extremidade, por *HindIII* (posição 1009). Estes produtos são distintos dos amplificados a partir de Moneymaker, clivados internamente por ambas as enzimas: *RsaI* (posições 386 e 1114) e *HindIII* (posições 712 e 1009).

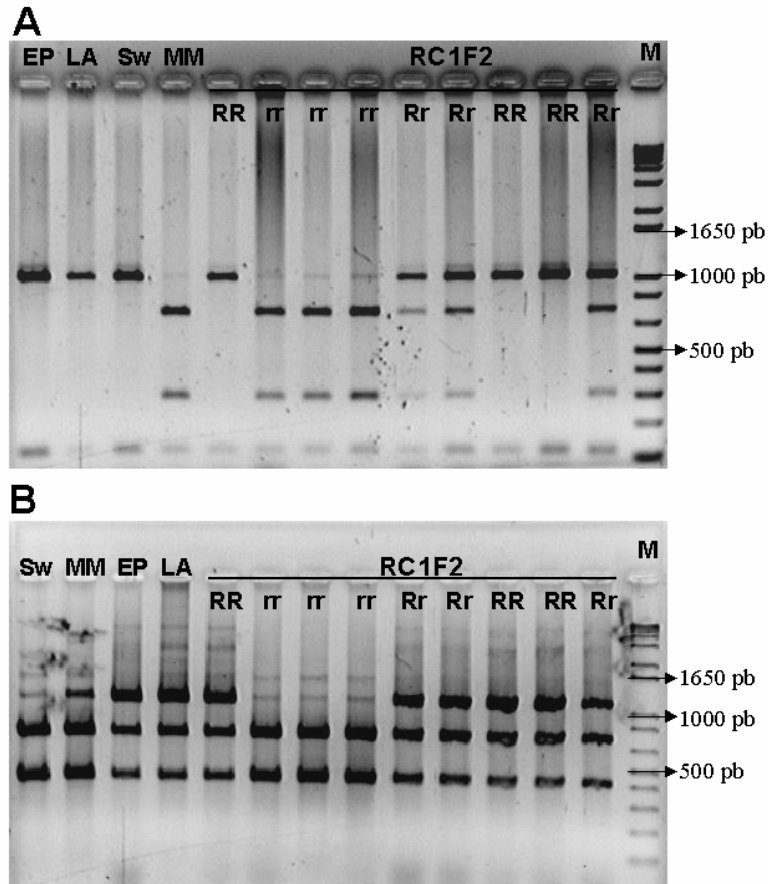


Figura 3 – Padrão de restrição de fragmentos amplificados a partir de DNA genômico de plantas RC_1F_2 , obtidas por Guimarães (2002), após a autofecundação de planta resistente do retrocruzamento entre o híbrido (LA371 X Moneymaker) e Moneymaker por meio de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B e FP12 que pareiam na região 5' do gene *Sw-5*. A) Clivagem com *HindIII*. B) Clivagem com *RsaI*. M - Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder; EP - Planta RC_1F_2 homozigota para a região genômica oriunda do acesso LA371-20; LA - planta original do acesso LA371-20; Sw - SW99-1; MM - Moneymaker; RR, Rr, rr - Homo ou heterozigose no loco inferida para plantas RC_1F_2 pelo referido autor, com base no marcador CAPS COS134FR localizado a aproximadamente 12 Kb do loco *Sw-5*.

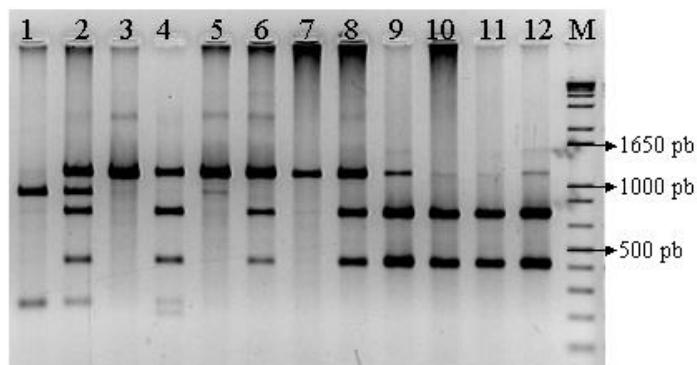


Figura 4 – Padrão de restrição *RsaI* de fragmentos amplificados a partir de DNA genômico de diferentes acessos de tomateiro e transformantes primários de tabaco por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a região 5' do gene *Sw-5*. M - Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder; 1 - H65-1; 2 - PI126928-2; 3 - H60-1; 4 - PI126944-6; 5 - H32-2; 6 - LA2753; 7 - H333-6; 8 - LA371-20; 9 - Moneymaker; 10 - H27-18 (tabaco transformado com o gene *Sw-5* oriundo de SW99-1); 11 - 16I-2; 12 - SW99-1.

A relação entre as seqüências homólogas a *Sw-5* amplificadas e a resistência a tospovírus presente no acesso LA371-20, foi estabelecida confrontando-se os dados de segregação destas seqüências com a resistência a tospovírus em plantas RC₁F₂, obtidas por Guimarães (2002) após a autofecundação do retrocruzamento entre o híbrido (LA371 X Moneymaker) e Moneymaker. Nas plantas resistentes, sempre se observa o padrão de restrição da seqüência que contém sítios *RsaI* e *HindIII* apenas na extremidade, ao passo que nas plantas suscetíveis, somente o padrão de restrição derivado do homólogo oriundo de Moneymaker é observado (Figura 3). Considerando que Guimarães (2002), por meio do marcador CAPS COS134FR localizado a aproximadamente 12 Kb do loco *Sw-5*, estabeleceu que a resistência a tospovírus co-segrega com este loco, deduz-se que as seqüências amplificadas são provenientes de locos situados nesta região e um dos dois ou ambos, são responsáveis pela resistência de LA371-20.

Confirmação dos transformantes de tabaco e tomateiro e avaliação da resistência a tospovírus

Por meio de PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a região 5' do gene *Sw-5*, foram confirmados 16 transformantes primários de tabaco e oito transformantes de tomateiro (Tabela 2). A análise de restrição dos fragmentos

amplificados demonstrou que a seqüência clonada e utilizada nas transformações corresponde à uma das seqüências homólogas amplificadas dos respectivos acessos selvagens de tomateiro (Figura 4).

Tabela 2 – Relação do número total de transformantes primários de tabaco e tomateiro, obtidos para cada um dos homólogos do gene *Sw-5* oriundos de diferentes acesso de tomateiro selvagem.

Planta transformada	Acesso	Código do transformante	Total de transformantes primários
Tabaco	<i>L. chilense</i> LA2753	H32	4
Tabaco	<i>L. peruvianum</i> LA371-20	H333	4
Tabaco	<i>L. peruvianum</i> 126944-6	H60	5
Tabaco	<i>L. peruvianum</i> 126928-2	H65	3
Tomateiro	<i>L. peruvianum</i> 126944-6	T60	3
Tomateiro	<i>L. peruvianum</i> 126928-2	T65	5

O número de inserções do transgene foi estimado pela análise de segregação para algumas progênies de tabaco, obtidas a partir da autofecundação dos transformantes primários (Tabela 3). A presença de pelo menos uma planta não-transformada, num total de no máximo 10 plantas avaliadas, sugere apenas uma inserção.

Tabela 3 – Análise da segregação do transgene em progênies oriundas da autofecundação de plantas de *Nicotiana tabacum* ‘Havana 425’, transformadas com homólogos do gene *Sw-5*.

Progênie	T:N.T*	Modelo	χ^2	P%
H32-4	6:3	3:1	0,33	56,37
H60-3	8:1	3:1	0,93	33,59
H60-4	9:1	3:1	1,20	27,33
H333-6	5:5	3:1	3,33	6,79
H333-7	8:2	3:1	0,13	71,50

*T:N.T – T: planta transformada, que apresenta o transgene conforme PCR; N.T: planta não-transformada

As folhas destacadas de tabaco e tomateiro transformados com os diferentes homólogos apresentaram lesões semelhantes às observadas nas folhas retiradas de plantas não-transformadas (controles negativos). As folhas de tabaco 16I-2 e de tomateiro transformado com o clone pGPP63 (controles positivos) exibiram reações locais necróticas típicas de resposta de hipersensibilidade.

Todas as plantas das progênies originadas da autofecundação dos transformantes primários foram suscetíveis, apresentando sintomas de infecção sistêmica por tospovírus. As plantas que compunham os controles positivos exibiram reações locais necróticas nas folhas inoculadas e nenhum sintoma de infecção sistêmica.

DISCUSSÃO

O acesso LA371-20 do tomateiro selvagem *L. peruvianum* é resistente à infecção por várias espécies de tospovírus (Guimarães, 2002). O espectro amplo e as lesões necróticas nas folhas inoculadas, características desta resistência, são similares à conferida pelo gene *Sw-5* (originário de um acesso de *L. peruvianum*). A resistência de LA371-20 é devida a um gene dominante localizado na região genômica do loco *Sw-5*, sendo possível que o gene *Sw-5*, um outro alelo deste loco ou um gene situado em loco próximo seja o responsável pela resistência (Guimarães, 2002).

Utilizando-se oligonucleotídeos desenhados a partir da seqüência do gene *Sw-5*, uma seqüência homóloga a esse gene foi amplificada a partir do acesso LA371-20 de *L. peruvianum*. Esta contém uma ORF que codifica uma proteína de 1.244 aminoácidos que apresenta 93,6% de identidade com a proteína codificada pelo gene *Sw-5* (Brommonschenkel et al., 2000). A maior parte da variação entre estas proteínas concentra-se nas regiões N-terminal e carboxi-terminal. A região central da proteína, onde se localiza o domínio NBS com os motivos cinase típicos das proteínas de resistência, é a mais conservada entre as proteínas. Esta seqüência, embora similar (92,2% de identidade), difere da descrita por Lima (2001), clonada a partir de outra planta (LA371-11) deste acesso. Este autor já havia detectado polimorfismo entre as seqüências homólogas amplificadas a partir de outros dois acessos de *L. peruvianum*: PI126944-6 e PI126928-2. É possível que estas seqüências correspondam a diferentes formas alélicas de um mesmo gene ou de genes homólogos situados em diferentes regiões genômicas.

Por meio de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos que permitem amplificar a região 5' de *Sw-5*, verificou-se que, após clivagem com enzima de restrição, nos diferentes acessos de tomateiro utilizados por Lima (2001), mais de uma seqüência homóloga pode ser amplificada. Nos casos em que apenas duas seqüências distintas foram amplificadas, estas poderiam corresponder a alelos de um mesmo loco. Contudo, a partir de alguns acessos até quatro produtos distintos foram amplificados, o que corresponderia no mínimo a dois locos em heterozigose. Excluindo-se a possibilidade de que essas seqüências tenham se originado de distintas regiões genômicas do tomateiro, as seqüências amplificadas não poderiam ter origem em um único loco e, portanto, podem ser derivadas de locos próximos contendo genes homólogos.

A partir do acesso LA371-20, pelo menos dois produtos distintos foram amplificados, sendo que um deles apresenta o padrão de restrição deduzido a partir da seqüência clonada. Como Guimarães (2002) determinou que a resistência presente em LA371-20 é devida a um gene dominante localizado na região genômica do loco *Sw-5*, procurou-se esclarecer se a seqüência homóloga clonada é originada da região do loco *Sw-5* e, portanto, corresponde ao gene que confere a resistência a tospovírus. A análise de alguns indivíduos de uma população RC_1F_2 obtida por Guimarães (2002), após a autofecundação do retrocruzamento entre o híbrido (LA371-20 X MoneyMaker) e MoneyMaker, indica que há associação entre o marcador CAPS COS134FR, situado a aproximadamente 12 Kb do loco *Sw-5* e o padrão 5' da seqüência clonada e, portanto, esta é oriunda da mesma região genômica que *Sw-5*. Como o segundo padrão de restrição também está presente em plantas homozigotas para esta região do acesso LA371-20, sugere-se que os dois produtos amplificados por PCR correspondam a dois genes proximamente ligados, talvez oriundos de um evento de duplicação gênica (genes parálogos). Isto estaria em acordo com Spassova et al. (2001) que seqüenciaram aproximadamente, 35 Kb deste segmento do genoma do tomateiro e encontraram dois genes ligados semelhantes a *Sw-5*.

Todas as quatro seqüências homólogas separadas para a análise funcional, apresentam ORF completa, semelhante à ORF *Sw-5*, sem deleções ou interrupções prematuras devidas a códons de terminação da tradução. No entanto, nenhuma delas foi capaz de conferir resistência a tospovírus em plantas transgênicas de tomateiro e tabaco. É possível que nenhuma das quatro seqüências avaliadas seja funcional, como também, a estrutura das construções utilizadas na transformação pode ter afetado a funcionalidade das seqüências. Na ausência de um controle positivo que contivesse rigorosamente as

mesmas características, ou seja, o alelo funcional clonado a partir de linhagem de tomateiro SW99-1 (Brommonschenkel et al., 2000) inserido da mesma forma no vetor binário, esta segunda possibilidade não pode ser descartada e apenas é possível apontar motivos de falha. A ausência das regiões reguladoras 5' e 3' do próprio gene pode ser um dos motivos. O gene *N*, por exemplo, não é completamente funcional quando expresso sob controle do promotor 35S (Dinesh-Kumar e Baker, 2000). Este não deve ser o caso destas construções em análise, uma vez que a ORF Sw-5 sob controle do promotor 35S foi capaz de conferir resistência a tospovírus em tabaco e *N. benthamiana* (Oliveira et al, 2001; Yamazaki, 2001; Capítulo 1). Contudo, ao contrário das construções analisadas no presente experimento, essas construções apresentavam a região 3' do gene *Sw-5*, a qual contém um sinal de poliadenilação (Lima, 2001). Esta região é fundamental para a plena funcionalidade do gene *N* (Dinesh-Kumar e Baker, 2000). Assim, a ausência desta região nas construções utilizadas no presente trabalho, poderia ter sido o elemento determinante da não-funcionalidade.

Apenas para a seqüência homóloga clonada a partir do acesso LA371-20, existem evidências de que foi amplificada a partir da região genômica responsável pela resistência a tospovírus e, portanto, pode corresponder ao gene que confere tal resistência. Para as demais seqüências, o único indício que apoia seu possível envolvimento na resistência dos acessos, a partir dos quais foram clonadas, é a similaridade com o gene *Sw-5*. No entanto, mesmo para o acesso LA371-20, existem dúvidas sobre o gene responsável pela resistência. O fato de o padrão de restrição correspondente à seqüência homóloga clonada segregar com a resistência, não permite refutar que o homólogo clonado seja responsável pela mesma. É possível que seqüências homólogas não-detectáveis pela análise de restrição, estejam envolvidas na resistência. O segundo homólogo presente na planta original, que está ligado ao homólogo clonado, também pode ser o gene responsável pela resistência ou contribuir para esta. Spassova et al. (2001) analisaram plantas de tabaco transformadas com os genes homólogos ligados que encontraram em tomateiro. Observaram que as plantas transformadas com um dos genes foram resistentes à infecção por tospovírus, enquanto que as plantas transformadas com o outro gene foram suscetíveis. Contudo, curiosamente, as plantas transformadas com ambos os genes mostravam-se ainda mais resistentes. Efeitos das regiões reguladoras destes genes não podem ser descartados, mas a expressão coordenada dos dois genes talvez seja importante para a resistência, haja vista a conservação observada em suas regiões promotoras.

Em resumo, a seqüência homóloga ao gene *Sw-5* clonada a partir do acesso LA371-20 de *L. peruvianum*, contém uma ORF sem deleções ou interrupções prematuras e, portanto, pode codificar uma proteína funcional que poderia estar envolvida na resistência a tospovírus. Esta hipótese é corroborada pelas análises que indicaram que esta seqüência foi amplificada a partir da região genômica que co-segrega com a resistência a tospovírus. Contudo, como mais de um produto é amplificado a partir desta região, é possível que genes homólogos ligados sejam responsáveis pela resistência. A clonagem do outro homólogo presente em LA371-20, bem como dos vários homólogos presentes nos demais acessos de tomateiro, o mapeamento da resistência nestes outros acessos e análises funcionais utilizando-se construções que contenham todos os elementos regulatórios necessários à adequada expressão da resistência, são necessários para inferir a importância destes homólogos na resistência a tospovírus nos diferentes acessos de tomateiro.

LITERATURA CITADA

- BOITEUX, L.S., GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, v.71, p.151-154, 1993.
- BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B.; ÁVILA, A.C.; SANTOS, J.R.M. 'TSW 10' Linhagem de tomate para mesa resistente a três espécies de tospovírus causadoras do Vira-cabeça. **Horticultura Brasileira**, v.11, p.163-164, 1993.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., TANKSLEY, S.D., FRARY, A., FRARY, A. OTONI, W.C., CHEAVEGATTI, A. Positional cloning, molecular characterization and heterologous expression of the tospovirus resistance gene *Sw-5*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998. Edinburgh, Scotland. **Proceedings...** Edinburgh, 1998, v.3. p.54.
- BROMMONSCHENCKEL, S.H., FRARY, A., 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 Interaction**, v.13, p.1130-1138, 2000.
- DINESH-KUMAR, S.P., BAKER, B. Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: Their possible role in *Tobacco mosaic virus* resistance. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.97, p.1908-1913, 2000.
- FRARY, A., EARLE, E.D. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. **Plant Cell Reports**, v.16, p.235-240, 1996.

- FULTON, T.M., CHUNWONGSE, J., TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.13, p.207-209, 1995.
- GUIMARÃES, L.M.S. **Introgessão de resistência a tospovírus no tomateiro cultivado por meio de cruzamentos interespecíficos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 62p. Dissertação (Tese de Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa,., 2002.
- HORSCH, R.B., FRY, J.E., HOFFMAN, N.L., EICHHOLTZ, D., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v.227, p.1229-1231, 1985.
- KRISHNA-KUMAR, N.K., ULLMAN, D.E., CHO, J.J. Evaluation of *Lycopersicon* germ plasm for *Tomato spotted wilt tospovirus* resistance by mechanical inoculation and thrips transmission. **Plant Disease**, v.77, p.938-941, 1993.
- LAU, D. **Análise de fatores que influenciam a resistência a tospovírus conferida pelo gene *Sw-5* em tomateiro e tabaco**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 84p. Dissertação (Tese de Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LIMA, G.S.A. **Resistência a tospovírus, clonagem e caracterização molecular de alelos do loco *Sw-5* em espécies de *Lycopersicon***. Viçosa, MG: UFV, 2001. 91p. Dissertação (Tese de Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LOURENÇÃO, A.L., SIQUEIRA, W.J., MELO, A.M.T., MELO, P.C.T., COLARICCIO, A., FONTE, L.C., CHAVES, A.L.R. Avaliação da resistência a tospovírus em cultivares e linhagens de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.17-23, 2001.
- OLIVEIRA, J.C., LAU, D., YAMAZAKI, E., LIMA, G.S.A., BROMMONSCHENKEL, S.H. A resistência conferida pelo gene *Sw-5* em sistema heterólogo é influenciada pelo isolado viral e número de cópias do transgene. In: XXXIV CONGRESSO NACIONAL DE FITOPATOLOGIA, 2001, São Pedro. **Resumos...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001, p.528.
- PATERSON, R.G., SCOTT, S.J., GERGERICH, R.C. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of *Tomato spotted wilt virus*. **Euphytica**, v.43, p.173-178, 1989.
- PICOLI, E.A.T., LIMA, G.S.A., LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C., ZERBINI, F.M. Heterologous expression of the *Sw-5* gene in eggplant (*Solanum melongena* L.) confers resistance to *tospovirus* infection. In: X ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 1999, Curitiba. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 1999, p.155.

- ROSELLÓ, S., DIEZ, M. J., NUEZ, F. Genetics of *Tomato spotted wilt virus* resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.499-509, 1998.
- ROSELLÓ, S., RICARTE, B., DIEZ, M.J., NUEZ, F. Resistance to *Tomato spotted wilt virus* introgressed from *Lycopersicon peruvianum* in line UPV1 may be allelic to *Sw-5* and can be used to enhance the resistance of hybrids cultivars. **Euphytica**, v.119, p.357-367, 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.
- SPASSOVA, M.I., PRINS, T.W., FOLKERTSMA, R.T., KLEIN-LANKORST, R.M., HILLE, J., GOLDBACH, R.W., PRINS M. The tomato gene *Sw-5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tabaco. **Molecular Breeding**, v.7, p.151-161, 2001.
- STEVENS, M.R., SCOTT, S.J., GERGERICH, R.C. Inheritance of gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, v.59, p.9-17, 1992.
- YAMAZAKI, E. **Resistência de tabaco e alface transformados com o gene *Sw-5*, sob o controle do promotor 35S, a três espécies de tospovírus**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 49p. Dissertação (Tese de Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

CONCLUSÕES

Plantas de *Nicotiana benthamiana* transformadas com o gene *Sw-5*, foram resistentes à infecção por tospovírus. Isto indica que as vias de sinalização e as respostas de defesa ativadas por este gene estão presentes nesta espécie, o que reforça a hipótese de conservação destas rotas dentro da família Solanaceae. Deduz-se, também, que a construção utilizada na transformação destas plantas (ORF *Sw-5* e a região 3' não-traduzida do gene) contém toda a informação necessária para produzir uma proteína funcional. A comparação do espectro da resistência observado em *N. benthamiana* com o observado para outras solanáceas, corrobora a hipótese de que o polimorfismo genético nos componentes das vias de transdução de sinais pode resultar em diferentes níveis de resistência.

A expressão isolada dos genes *N*, *NSm* e *NSs* dos tospovírus em plantas com *Sw-5*, não foi capaz de desencadear a resposta de hipersensibilidade, portanto, outro componente dos tospovírus deve ser responsável pelo desencadeamento da reação de resistência. A expressão do gene *NSs* por meio do vetor PVX, agravou os sintomas provocados por este vírus em algumas solanáceas, o que pode ter relação com a capacidade desta proteína de suprimir silenciamento gênico.

A co-expressão transitória da região 5' de *Sw-5* em plantas transformadas com este gene, interferiu na resposta de resistência a tospovírus, permitindo a infecção viral. Dado que o efeito foi verificado para a co-expressão tanto de construções senso quanto anti-senso, é possível, embora não demonstrado, que o silenciamento gênico tenha sido ativado reduzindo os níveis do mRNA de *Sw-5* e, conseqüentemente, da resistência.

A partir do acesso LA371-20, foi clonado um homólogo do gene *Sw-5*. Análises indicaram que este homólogo é originado do loco *Sw-5* ou de região próxima a este e que segrega com a resistência a tospovírus. Aparentemente, esta região genômica contém mais de um homólogo que pode, portanto, estar envolvido na resistência deste acesso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDLA, M.D., CAMPBELL, L.R., ULLMAN, D.E., SHERWOOD, J.L. Interaction of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. **Phytopathology**, v.88, p.98-104, 1998.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., TANKSLEY, S.D., FRARY, A., FRARY, A. OTONI, W.C., CHEAVEGATTI, A. Positional cloning, molecular characterization and heterologous expression of the tospovirus resistance gene *Sw-5*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998. Edinburgh, Scotland. **Proceedings...** Edinburgh, 1998, v.3. p.54.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., FRARY, A., 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**, v.13, p.1130-1138, 2000.
- DE HAAN, P., WAGEMAKERS, L., PETERS, D., GOLDBACH, R. The S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. **Journal of General Virology**, v.71, p.1001-1007, 1990.
- DE HAAN, P., KORMELINK, R., RESENDE, R.O., VAN POELWIJK, F. PETERS, D., GOLDBACH, R. *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal of General Virology**, v.71, p.2207-2216, 1991.
- GERMAN, T.L., ULLMAN, D.E., MOYER, J.W. *Tospoviruses*: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.315-348, 1992.
- GOLDBACH, R., PETERS, D. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. **Seminars in Virology**, v.5, p.113-120, 1994.

- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.
- KIKKERT, M., MEURS, C., VAN DE WETERING, F., DORFMÜLLER, S., PETERS, D., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. Binding of *Tomato spotted wilt virus* to a 94 kDa thrips protein. **Phytopathology**, v.88, p.63-69, 1998.
- KIKKERT, M., VAN LENT, J., STORMS, M., BODEGOM, P., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. *Tomato spotted wilt virus* particle morphogenesis in plant cells. **Journal of Virology**, v.73, p.2288-2297, 1999.
- KORMELINK, R., DE HAAN, P., MEURS, C., PETERS, D., GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of *Tomato spotted wilt virus*, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **Journal of General Virology**, v.73, p.2795-2804, 1992a.
- KORMELINK, R., VAN POELWIJK, F., PETERS, D., GOLDBACH, R. Non viral heterogenous sequences of the 5' ends of *Tomato spotted wilt virus* MRNAs. **Journal of General Virology**, v.73, p.2125-2128, 1992b.
- KORMELINK, R., STORMS, M., VAN LENT, J., PETERS, D., GOLDBACH, R. Expression and subcellular location of the NS_m protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology**, v.200, p.56-65, 1994.
- LIMA G.S.A., PICOLI, E.A.T., LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C., ZERBINI, F.M. Signal transduction pathways mediated by the *Sw-5* are conserved in eggplant. In: 11th National Meeting of Virology, 2000, São Lourenço. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 2000, p.191-192.
- MARTIN, G.B., BOGDANOVE, A.J., SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p.23-61, 2003.
- PETERS, D., WIJKAMP, I., VAN DE WETWRING, F., GOLDBACH, R. Vector relations in the transmission and epidemiology of tospoviruses. **Acta Horticulturae**, v.431, p.29-43, 1996.
- PICOLI, E.A.T., LIMA, G.S.A., LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C., ZERBINI, F.M. Heterologous expression of the *Sw-5* gene in eggplant (*Solanum melongena* L.) confers resistance to *tospovirus* infection. In: X ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 1999, Curitiba. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 1999, p.155.
- 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**, v.59, p.9-17, 1992.
- STORMS, M.M.H., KORMELINK, R., PETERS, D., VAN LENT, J.W.M., GOLDBACH, R. The nonstructural NS_m protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. **Virology**, v.214, p.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**, v.532, p.75-79, 2002.
- ULLMAN, D.E., CHO, J.J., MAU, R.F.L., WESTCOT, D.M., CUSTER, D.M. A midgut barrier to *Tomato spotted wilt virus* acquisition by adult western flower thrips. **Phytopathology**, v.82, p.1333-1342, 1992.
- 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 S RNA of *Tomato spotted wilt virus* is present in thrips vector cells. **Phytopathology**, v.83, p.456-463, 1993.
- VANCE, V., VAUCHERET, H. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. **Science**, v.292, p.2277-2280, 2001.
- VAN POELWIJK, F., DE HAAN, P, KIKKERT, M., PRINS, M., KORMELINK, R., STORMS, M., VAN LENT, J., PETERS, D., GOLDBACH, R. Replication and expression of tospoviral genome. **Acta Horticulturae**, v.431, p.201-208, 1996.
- 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**, v.74, p.341-349, 1993.