



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDO DOS GENES DE VIRULÊNCIA E
AVIRULÊNCIA ENVOLVIDOS NA
INTERAÇÃO TOSPOVÍRUS/PLANTA
HOSPEDEIRA**

MARIANA HALLWASS

Brasília, 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

ESTUDO DOS GENES DE VIRULÊNCIA E AVIRULÊNCIA ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO TOSPOVÍRUS/PLANTA HOSPEDEIRA

Estudante de Doutorado: Mariana Hallwass

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende

Co-Orientadora: Dr^a. Alice Kazuko Inoue Nagata

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do grau de doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 2011

Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**ESTUDO DOS GENES DE VIRULÊNCIA E
AVIRULÊNCIA ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO
TOSPOVÍRUS/PLANTA HOSPEDEIRA**

Banca Examinadora

Dr. Renato de Oliveira Resende (orientador) - Professor do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília

Dr^a. Marília Santos Silva - Pesquisadora da Embrapa Cerrados

Dr. Cristiano Lacorte - Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos

Dr. Francisco José Lima Aragão - Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos

Dr. Tatsuya Nagata - Professor do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília

Brasília, 2011

“E, se alguém deseja a profundidade da ciência, ela é que sabe o passado, e que julga o futuro; penetra a sutileza dos discursos e a soluções dos argumentos; conhece os sinais e os prodígios antes que eles apareçam, o que tem de acontecer no decurso dos tempos e dos séculos. Eu, pois, resolvi-me a tomá-la por companheira da minha vida, sabendo que ela repartirá comigo dos seus bens, e que será o meu conforto nos meus cuidados e dissabores.”

(Sabedoria 8-9, Antigo Testamento)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Renato de Oliveira Resende, e à minha co-orientadora, Dr^a. Alice Kazuko Inoue Nagata, pelos ensinamentos transmitidos, orientação, exemplo, receptividade e incentivo proporcionados durante a realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

Ao Dr. Tatsuya Nagata, pelas sugestões para o desenvolvimento dos experimentos.

À Dr^a. Isabel Cristina Bezerra-Agassi pela oportunidade oferecida de continuar na área de pesquisa, logo após o término do mestrado e porque sem ela não teria conhecido a Dr^a. Alice Nagata.

Aos membros da banca examinadora, por se disponibilizarem a analisar este trabalho acadêmico.

À Dra. Fernanda Antinolfi Lovato por me conceder a oportunidade de continuar o seu trabalho.

Aos meus amigos Lúcio Flávio Barbosa e Oneilson Medeiros, pela ajuda nos experimentos, incentivo e amizade, fundamentais para o desenvolvimento da tese.

Ao Sr. Hamilton Lourenço, por manter as plantas sempre prontas para os experimentos.

Ao Leonardo Cunha de Albuquerque, pelo auxílio com os programas de análise de sequências.

Aos amigos Mariana Martins, Bruna, Fernanda Naito, Érico Dianese, Paulo, Mariana F., Edmércia, Sílvia e Maciel pelos bons momentos de convívio no laboratório; e em especial à Sarah, pelo apoio, amizade e conversas incentivadoras.

Aos integrantes do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, pela ajuda e suporte técnico proporcionado.

À Dr^a. Virgínia Carla de Oliveira, pela amizade e por sempre me socorrer sempre que precisava de algum material do laboratório de virologia.

À Ana, secretária do Departamento de Biologia Celular da UnB, pela sua atenção, dedicação e pela permanente disponibilidade a ajuda.

À Embrapa Hortaliças, pelo excelente suporte técnico e profissional proporcionado.

À Capes, pela concessão da bolsa de pesquisa.

À Universidade de Brasília e ao seu Departamento de Biologia Celular pela oportunidade do doutorado.

À minha amiga Fabiana, que mesmo distante, sempre me apoiou, compartilhando os bons e difíceis momentos.

Aos meus pais, pelo carinho, dedicação, amor incondicional, incentivo e apoio durante o doutorado.

Às minhas irmãs Lilian e Daniela pelo incentivo.

Ao Guilherme, pelo companheirismo e por toda ajuda prestada durante o doutorado.

A segunda parte dos agradecimentos é para a equipe do Laboratório da Universidade de Wageningen.

Agradeço ao Dr. Richard Kormelink, da Universidade de Wageningen, por me receber no seu laboratório e contribuir para o desenvolvimento de parte desta tese.

Aos Doutores Dick Peters e Jan Van Lent, pelo apoio e sugestões no desenvolvimento do meu experimento.

Ao Dick Lohuis, técnico do laboratório, por compartilhar seus conhecimentos no desenvolvimento dos experimentos.

Ao grupo de trabalho, Cristina, Corinne, Stineke, Paulus, Afshin, Patrick, Vera e Márcio Hedil.

Às secretárias Thea e Marleen por resolverem os meus problemas administrativos.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram.

À Deus, por guiar meus passos na condução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E NOMES CIENTÍFICOS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	xx
CAPÍTULO I	22
1. Família <i>Bunyaviridae</i> e o gênero <i>Tospovirus</i>	22
2. Classificação dos tospovírus	22
3. Organização genômica	26
4. Transmissão e ciclo de infecção dos tospovírus	30
5. Ocorrência de Tospovírus	34
6. Controle dos tospovírus	35
7. Mecanismo de defesa das plantas contra patógenos	40
8. Sistema imune de vigilância em plantas e mamíferos	44
9. Reguladores da morte celular em plantas	47
10. Vetores de expressão de genes em planta	48
OBJETIVOS	52
CAPÍTULO II	54
1. Introdução	55
2. Materiais e Métodos	56
2.1 Isolado viral e plantas utilizadas.....	56
2.2 Extração do RNA total.....	57
2.3 Síntese do cDNA viral e amplificação.....	57
2.4 Clonagem e sequenciamento do fragmento amplificado.....	57
2.5 Isolado ZLCV.....	58
2.6 Análise das sequências do GRSV e do ZLCV.....	58
3. Resultados	59
3.1 Amplificação e clonagem do cDNA do GRSV.....	59

3.2 Sequenciamento e análise da região 5'UTR e NS _S do GRSV e do ZLCV	59
3.3. Análise filogenética dos tospovírus baseada nas proteínas NS _S e N.....	62
4. Discussão.....	65
CAPÍTULO III.....	68
1. Introdução.....	69
2. Materiais e Métodos.....	71
2.1 Síntese de oligonucleotídeos	71
2.2 Isolado viral de TCSV e purificação do RNA viral	71
2.3 Síntese do cDNA (Gene <i>N</i> do TCSV) e PCR.....	72
2.4 Reação da Polimerase em Cadeia - PCR.....	72
2.5 Amplificação do gene <i>N</i> do TSWV isolado BR-01.....	73
2.6 Amplificação do gene <i>N</i> do TCSV.....	73
2.7 Amplificação das quimeras do gene <i>N</i> do TSWV com TCSV.....	74
2.8 Digestão e construção dos vetores recombinantes	74
2.9 Inoculação dos clones de <i>A. tumefaciens</i> em <i>Capsicum chinense</i>	75
3. Resultados	75
3.1 Amplificação do gene <i>N</i> do TSWV isolado BR01	75
3.2 Amplificação do gene <i>N</i> do TCSV	76
3.3 Amplificação das quimeras do gene <i>N</i> do TSWV com TCSV.....	78
3.4. Construção dos vetores de expressão e agroinfiltração em plantas de <i>C. chinense</i> ..	80
4. Discussão.....	82
CAPÍTULO IV.....	86
1. Introdução.....	87
2. Materiais e Métodos.....	88
2.1 Clonagem dos genes <i>N</i> , <i>NS_M</i> e <i>NS_S</i> no vetor de entrada pENTR11	88
2.2. Clonagem dos genes <i>G_N</i> e <i>G_C</i> no vetor pENTR2B.....	90
2.3. Clonagem do precursor das Glicoproteínas (GP) no vetor pENTR11	91
2.4. Recombinação com o vetor pEAQ Gateway.....	91
2.5. Uso de <i>N. benthamiana</i> transgênica (transformada com o gene <i>Sw-5</i>) para determinação do gene de avirulência	93
2.6. Preparo das soluções para agroinfiltração de <i>A. tumefaciens</i> em plantas de <i>N.</i> <i>benthamiana</i>	93
2.7. Agroinfiltração das construções, contendo individualmente os genes <i>N</i> , <i>NS_S</i> , <i>NS_M</i> , de TSWV isolado BR-01 mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	94

2.8. Agroinfiltração das construções, contendo os genes <i>N</i> , <i>NS_S</i> , <i>NS_M</i> , <i>GP</i> , <i>G_N</i> e <i>G_C</i> do TSWV isolado BR-01 e <i>NS_M</i> isolado GRAU mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> no vetor pEAQ- <i>HT</i> GW	94
2.9. Co-infiltração das construções no vetor pEAQ- <i>HT</i> GW, contendo os genes <i>N</i> , <i>NS_S</i> , <i>NS_M</i> , <i>GP</i> , <i>G_N</i> e <i>G_C</i> de TSWV isolado BR-01 mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	95
2.10. Co-infiltração das construções contendo os genes <i>N</i> , <i>NS_S</i> , <i>NS_M</i> , <i>GP</i> , <i>G_N</i> e <i>G_C</i> de TSWV isolado BR-01 e <i>NS_M</i> isolado GRAU mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> em combinação com o vetor pCGN + <i>Sw-5b</i>	95
2.11. ELISA e Western blot	96
2.12. Remoção da clorofila.....	96
3. Resultados	96
3.1 Ensaio de expressão em plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> não transgênica, utilizando o vetor de expressão pGR107, contendo os genes <i>N</i> , <i>NS_M</i> , <i>NS_S</i> do TSWV-BR-01 e o gene <i>NS_M</i> do TSWV isolado GRAU.....	96
3.2 Ensaio de expressão em plantas de <i>N. benthamiana</i> transgênica, utilizando o vetor de expressão pGR107, contendo os genes <i>N</i> , <i>NS_M</i> , <i>NS_S</i> do TSWV-BR-01 e o gene <i>NS_M</i> do TSWV isolado GRAU	98
3.3 Visualização dos sintomas e expressão do gene <i>NS_M</i> do TSWV isolado BR-01 e isolado GRAU	99
3.4 Ensaio de expressão em plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> transgênica, utilizando os vetores de expressão pEAQ- <i>HT</i> contendo os genes <i>N</i> , <i>NS_M</i> , <i>NS_S</i> , <i>GP</i> , <i>G_N</i> e <i>G_C</i> do TSWV-BR-01 e o gene <i>NS_M</i> do TSWV isolado GRAU	101
3.5 Ensaio de expressão em plantas de <i>N. benthamiana</i> transgênica por meio de co-infiltração de combinações dos vetores de expressão, contendo os genes <i>N</i> , <i>NS_M</i> , <i>NS_S</i> , <i>GP</i> , <i>G_N</i> e <i>G_C</i> do TSWV-BR-01	104
3.6 Co-infiltração das construções, contendo os genes <i>N</i> , <i>NS_S</i> , <i>NS_M</i> , <i>GP</i> , <i>G_N</i> e <i>G_C</i> de TSWV isolado BR-01 e <i>NS_M</i> isolado GRAU mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> em combinação com o vetor pCGN + <i>Sw-5b</i>	106
4. Discussão	107
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura da partícula viral e organização genômica.....	29
Figura 1.2: Ciclo de infecção do TSWV na célula vegetal.....	32
Figura 1.3: Representação esquemática do mecanismo de montagem da partícula viral.....	33
Figura 1.4. Representação esquemática do vetor de clonagem pGR107 (PVX).....	50
Figura 1.5. Representação esquemática do vetor de clonagem pGreenII 62-SK.....	51
Figura 1.6. Representação esquemática do vetor de clonagem pEAQ- <i>HT</i> Gateway.....	51
Figura 2.1: Eletroforese em gel de agarose, mostrando a amplificação da região 5'UTR em conjunto com o gene <i>NSs</i> do GRSV.....	59
Figura 2.2: Árvore filogenética construída a partir das seqüências de aminoácidos da proteína <i>NSs</i>	63
Figura 2.3: Árvore filogenética construída a partir das seqüências de aminoácidos da proteína <i>N</i>	64
Figura 3.1: Sequência do gene <i>N</i> do TSWV e produtos amplificados do gene <i>N</i> do TSWV.....	76
Figura 3.2: Sequência do gene <i>N</i> do TCSV e produtos amplificados do gene <i>N</i> do TCSV....	77
Figura 3.3: Quimeras originadas a partir do gene <i>N</i> do TSWV com TCSV.....	79
Figura 3.4: Representação esquemática das construções em pGreenII com os genes <i>N</i> do <i>Tomato spotted wilt virus</i> e <i>Tomato chlorotic spot virus</i> e suas quimeras.....	81
Figura 3.5: Agroinfiltração em folhas de <i>C. chinense</i>	82
Figura 4.1: Representação esquemática das construções em pGR107 com três genes do <i>Tomato spotted wilt virus</i> (<i>N</i> , <i>NSs</i> e <i>NSM</i>).....	89
Figura 4.2: Vetores do sistema Gateway pENTR11 e pENTR2B (vetores de entrada).....	90
Figura 4.3: Representação esquemática do vetor de clonagem pEAQ- <i>HT</i> Gateway.....	92

Figura 4.4: Sintomas de clorose internerval e mosqueado em plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	97
Figura 4.5: Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> (<i>Sw-5b</i>) agroinfiltradas com as construções do vetor pGR107	99
Figura 4.6: Folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> (<i>Sw-5b</i>) tratadas com etanol e expressão das proteínas NS _M isolado BR-01 e GRAU do TSWV, utilizando a técnica de Western blot agroinfiltrada com PVX + NS _M isolado GRAU.....	100
Figura 4.7: Sintomas de clorose causados pela agrobactéria LB4404 em plantas de <i>N. benthamiana</i> expressando o gene <i>Sw-5b</i>	102
Figura 4.8: Expressão das proteínas NS _S , N, e NS _M isolado BR-01 e GRAU do TSWV, utilizando a técnica de Western blot.....	103
Figura 4.9: Avaliação da expressão das proteínas NS _S , N, NS _M e GP isolado BR-01 do TSWV, utilizando a técnica de Western blot.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Espécies de tospovírus reconhecidas pelo ICTV, espécies de tripes vetores e distribuição geográfica.....	24
Quadro 1.2: Espécies tentativas de tospovírus, espécies de tripes vetores e distribuição geográfica.....	25
Quadro 1.3: Proteínas NB-LRR que conferem resistência a vírus em plantas.....	44
Quadro 3.2: Programas utilizados para amplificar o gene <i>N</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Características da NSs e da região 5' não traduzida de diferentes espécies de tospovírus	61
Tabela 2.2: Porcentagem de identidade da proteína não estrutural NS _S entre espécies de tospovírus.....	62
Tabela 3.1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes quiméricos da proteína do nucleocapsídeo (N) de TSWV isolado BR-01 com TCSV.....	71
Tabela 4.1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes <i>N</i> , <i>NS_S</i> , <i>NS_M</i> e <i>GP</i> do TSWV isolado BR-01 e <i>NS_M</i> do TSWV isolado GRAU.....	92

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E NOMES CIENTÍFICOS

ATP: adenosina trifosfato

Da: daltons

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: deoxinucleotídeos

dsRNA: *double strand RNA* – RNA de fita dupla

g: grama

GP: precursor das glicoproteínas

GRSV: *Groundnut ringspot virus*

h: hora

Kb: quilobase - 1000 pares de base

KDa: quilodalton – 1000 Da

M: molar

mg: miligrama

mM: milimolar

MS: Murashige & Skoong, meio de cultura

N: proteína do nucleocapsídeo

NS_M: proteína de movimento

NS_S: proteína com atividade supressora de silenciamento gênico

nm: nanômetro

ORF: *open reading frame* – fase de leitura aberta

pb: pares de base

PBS: *salino phosphate-buffered* – tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial de hidrogênio

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado por SDS (dodecilsulfato de sódio)

siRNA: *small interference RNA* – RNA curto de interferência

Sw-5: gene presente em tomate que confere resistência aos tospovírus TSWV, TCSV e GRSV

TCSV: *Tomato chlorotic spot vírus*

Tsw: gene presente em *Capsicum chinense* que confere resistência ao tospovírus TSWV

TSWV BR-01: *Tomato spotted wilt virus* isolado BR-01, oriundo do Brasil

TSWV GRAU: *Tomato spotted wilt virus* isolado GRAU, oriundo da Espanha. Responsável por gerar a resistência conferida pelo gene *Sw-5*

ZLCV: *Zucchini lethal chlorosis vírus*

µg: micrograma

µL: microlitro – 10⁶ litro

µM: micromolar

RESUMO

Espécies do gênero *Tospovirus* têm sido relatadas como agentes causais de doenças em diferentes culturas, no mundo, sendo transmitidos por diferentes espécies de tripses. O *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) é a espécie-tipo do gênero *Tospovirus* e possui uma ampla gama de hospedeiros quando comparado com outros vírus do gênero. A partícula viral é envelopada e contém três segmentos de RNA designados S, M e L, que codificam duas proteínas não-estruturais (NS_M e NS_S) e três proteínas estruturais (L, N e o precursor das glicoproteínas G_N e G_C). A proteína NS_M está envolvida no movimento do vírus célula-a-célula, enquanto que a NS_S está envolvida na supressão de silenciamento gênico em plantas, demonstrado para o TSWV e para outro tospovírus, o *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) e também está relacionada com a expressão de sintomas nos tecidos foliares. Visando minimizar os danos causados por tospovírus, principalmente em cultivos de olerícolas, genes de resistência têm sido incorporados em variedades comerciais como o *Tsw* em pimentão e o *Sw-5* em tomate. O entendimento dos processos de interação desses genes de resistência com genes virais constitui estratégia importante na durabilidade e estabilidade da resistência a esses patógenos. Este trabalho teve como objetivo geral estudar a interação entre tospovírus e plantas e foi dividido em três capítulos, sendo que no primeiro capítulo, foram determinadas as sequências completas de nucleotídeos do gene NS_S de dois tospovírus relatados no Brasil, *Groundnut ring spot virus* (GRSV) e do *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV). As sequências foram comparadas com outras sequências NS_S de tospovírus, disponíveis no banco de dados, permitindo a construção de árvores filogenéticas. Verificou-se que a NS_S do GRSV e do ZLCV apresentou o mesmo tamanho, 1.404 nucleotídeos. A comparação das sequências de aminoácidos de GRSV com ZLCV mostrou uma identidade de 69,6%. Análises filogenéticas foram realizadas com base nas sequências NS_S depositadas no banco de dados, confirmando que as espécies estudadas pertencem ao grupo americano. O segundo capítulo foi dedicado ao estudo da interação entre TSWV e uma cultivar de pimenta resistente à infecção. No Brasil e no mundo, o estudo e o entendimento da morte celular programada (PCD) em células vegetais, induzida por infecções causada por fitopatógenos, ainda é incipiente. Resultados preliminares de ocorrência de PCD foram obtidos, utilizando o patossistema TSWV em *Capsicum chinense* 'PI 159236'. Com o objetivo de estudar os domínios da proteína do nucleocapsídeo (N) de TSWV, responsável pela indução de reação de hipersensibilidade (RH) em genótipos de pimenta, foram construídas quimeras com troca

de fragmentos genômicos do gene *N* de TSWV e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) (responsável por causar infecção sistêmica em alguns genótipos de pimenta), usando como ferramenta o vetor de expressão transiente pGreenII 62-K. Agroinfiltrações com as construções e um controle negativo, que consistiu da bactéria mais o meio de indução, foram realizadas em plantas de *C. chinense*. Sintomas de necrose foram observados nas folhas com 10 a 12 dias após a infiltração. O sintoma de necrose ocorreu devido à incompatibilidade da interação agrobactéria GV3101/*C. chinense*, sendo necessário, em uma próxima etapa do trabalho, utilizar outra cepa de *Agrobacterium* mais adequada a este tipo de avaliação e que não induza, precocemente, o sintoma de necrose foliar. O terceiro capítulo consistiu do aprofundamento dos estudos da interação entre TSWV e um gene de resistência derivado do tomateiro. Interações entre plantas e vírus são complexas e envolvem vários tipos de respostas que podem ou não causar doenças no hospedeiro. A RH é um mecanismo utilizado pelas plantas para impedir a disseminação do patógeno para as células vizinhas. Para identificar o gene do TSWV isolado BR-01, responsável por desencadear uma resposta do tipo RH em plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênica (expressando o gene de resistência derivada do tomateiro: *Sw-5b*), os genes das proteínas *N*, *NS_M* e *NS_S* foram clonados, individualmente, no vetor binário pGR107 (pPVX - *Potato virus X*) e no vetor de expressão transiente pEAQ-*HT Gateway*, que também recebeu os genes *G_N* e *G_C* e o precursor da glicoproteína. Plantas de *N. benthamiana* (*Sw-5b*) foram agroinfiltradas com as construções obtidas em pGR107 e pEAQ-*HT GW*. Lesões necróticas do tipo RH foram observadas apenas nas plantas inoculadas com a construção pGR107 + *NS_M*, diferindo dos sintomas causados pelas construções pGR107 + *N* e pGR107 + *NS_S*. Entretanto, em inoculações realizadas com o vetor pEAQ, não foram observados sintomas do tipo RH nas agroinfiltrações realizadas com a construção pEAQ-*HT GW* + *NS_M*. Verificou-se que a proteína *NS_M* apresentou-se fragmentada em duas bandas quando detectada por Western blot, podendo ser esta a causa do não aparecimento da resposta do tipo RH com a inoculação dessa construção. Outra hipótese seria a necessidade de translocação da proteína *NS_M* para a indução da RH, fato que poderia ser propiciado pelo vetor PVX, porém não ocorreria com o vetor de expressão pEAQ-*HT GW*. Visando a elucidação dessas hipóteses os trabalhos serão continuados.

ABSTRACT

Species of genus *Tospovirus* have been reported as causative agents of diseases in many different crops, worldwide. They are transmitted by several different species of thrips. The species type *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) of the genus *Tospovirus*, has a broad host range if compared with other viruses of the genus. The viral particle is enveloped and contains three ssRNA segments denoted S, M and L, encoding two non-structural proteins (NS_M e NS_S) and three structural proteins (L, N, and the glycoprotein precursor of G_N and G_C). The NS_M protein is involved in the cell-to-cell movement, whereas NS_S acts as silencing suppressor in the affected plants. This role was demonstrated for both TSWV and *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV). The NS_S is also related to the symptoms expression in plants. Strategies to minimizing the damages caused by tospoviruses, mainly in horticultural crops have been implemented based on resistance genes as *Tsw* in sweet-pepper and *Sw-5* in tomato. Understanding the interactions between resistance and viral genes are essential to generate stable and durable resistance to these pathogens. This work had the general aim to study the interaction of tospoviruses and plants and it was divided into three chapters. In the first chapter, the complete nucleotide sequence of NS_S gene of two tospoviruses *Groundnut ring spot virus* (GRSV) and *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) were determined. The NS_S sequence of GRSV and ZLCV was both 1,404 nucleotides-long. Pairwise comparison showed that the NS_S amino acid sequence of GRSV shared 69.6% identity with that of ZLCV. The sequences were compared with other NS_S sequences of tospovirus available in the database. Phylogenetic analysis based on NS_S sequences confirmed that these species cluster in the American clade. The second chapter was devoted to study the interaction between TSWV and a pepper cultivar resistant to the infection. The understanding of programmed cell death (PCD) in plants, induced by pathogens, is still incipient. Previous results about the PCD occurrence were obtained by using the pathosystem TSWV/ *Capsicum chinense* 'PI159236'. In order to study the nucleocapsid protein (N) domains of TSWV, responsible to cause a hypersensitive response (HR) in pepper genotypes, chimeras were constructed with genomic fragments of TSWV and *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) (responsible for causing systemic infection in some sweet pepper genotypes) was cloned into the pGreenII 62-K, a transient expression vector. Agroinfiltration was carried out in *C. chinense* plants with the pGreenII constructs and the negative control (just the *Agrobacterium* in the medium). Necrotic symptoms were observed 10 to 12 days after infiltration. The necrosis occurred due

to the interaction incompatibility between *Agrobacterium* GV 3101 and *C. chinense* plants. It was concluded that a different *Agrobacterium* strain that does not induce necrotic symptoms in the leaf must be used to enable this study, in a next step of this work. In the third chapter the interaction between TSWV and the resistance gene *Sw-5* from tomato was studied. Interactions between plant and viruses are complex and involve several types of responses that may or may not cause disease to the host. The HR is a mechanism used by plants to prevent the spread of the pathogen to the neighboring cells. In order to identify the TSWV isolate BR-01 gene, responsible for triggering the HR in the transgenic *Nicotiana benthamiana* plants (*Sw-5b*), the *N*, *NS_M* and *NS_S* genes were cloned individually in frame into the vector pGR107 (pPVX – *Potato virus X*) and into the transient expression vector pEAQ-*HT* Gateway. The *G_N*, *G_C* and Glycoprotein precursor were cloned to into the pEAQ-*HT* GW vector. The constructs were agroinfiltrated in the transgenic *N. benthamiana* (*Sw-5*). HR-like necrotic lesions were seen only in leaves inoculated with the construct pGR107 + *NS_M*, which differed significantly with symptoms caused by pGR107 + *N* and pGR107 + *NS_S*. HR-like symptoms were not observed with pEAQ-*HT* GW + *NS_M*. It was observed that the *NS_M* protein was not intact since two bands were detected by Western blot, suggesting that this could be the cause of the absence of the HR symptom in the inoculated plants. Another explanation would be the necessity of the *NS_M* protein to move cell-to-cell to induce HR. This movement could be provided by the PVX vector, however does not occur when the pEAQ-*HT* GW was used. To elucidate these possible hypotheses, these studies will still be continued.

INTRODUÇÃO

Dentre as fitoviroses que se manifestam em hortaliças no Brasil, as tospoviroses destacam-se como uma das mais importantes, podendo os tospovírus infectar diversas espécies olerícolas, principalmente solanáceas, causando sérios prejuízos que podem chegar até 100% de perdas, dependendo da cultura (Colariccio *et al.*, 2001). No Brasil, as tospoviroses representam doenças de grande importância econômica nas culturas da pimenta, do pimentão e do tomate. Durante as últimas décadas, além do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), foram identificadas as espécies *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), responsáveis por grandes danos econômicos em importantes culturas no Brasil (Pozzer *et al.*, 1999; Bezerra *et al.*, 1999).

O *Tomato spotted wilt virus* é a espécie-tipo do gênero *Tospovirus*, o qual é o único gênero conhecido que infecta plantas dentro da família *Bunyaviridae*. Os tospovírus são transmitidos de maneira circulativa/propagativa por insetos denominados tripes (Sakimura, 1963; Wijkamp *et al.*, 1995) e são caracterizados por possuírem um genoma composto por três RNAs, denominados L, M e S. O RNA L codifica a provável polimerase viral (RdRp) (de Haan *et al.*; 1991). O RNA M codifica a proteína não-estrutural de movimento NS_M (Kormelink *et al.*, 1994; Storms *et al.*, 1995) e o precursor das glicoproteínas G_N e G_C. (Kormelink *et al.*, 1992). O RNA S codifica a proteína não estrutural NS_S e a proteína do nucleocapsídeo N (de Haan *et al.*, 1990; Snippe *et al.*, 2007).

Segundo o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus, a classificação dos tospovírus em nível de espécie obedece aos seguintes critérios: especificidade do vetor (espécies de tripes), círculo de hospedeiros, sorologia da proteína do nucleocapsídeo (N) e identidade de aminoácidos da proteína N. A maior parte das sequências de tospovírus disponíveis nos bancos de dados corresponde ao gene N, pouco se conhece sobre a NS_S de espécies de tospovírus e, em particular sobre a NS_S de tospovírus brasileiros.

Os sintomas causados por tospovírus diferem conforme a idade e o estado nutricional das plantas e espécie de tospovírus. Em pimenta, os sintomas provocados pela infecção com TSWV variam em função do genótipo da planta hospedeira, podendo causar clorose e necrose nas folhas novas, encurvamento apical das folhas, lesões necróticas, usualmente concêntricas nas folhas, caules e frutos (Boiteux e de Ávila, 1994). Já em tomateiro, os sintomas podem variar desde o arroxamento das folhas à formação de anéis cloróticos e/ou necróticos nos

folíolos, necrose, e a planta pode apresentar nanismo e encurvamento apical (Francki e Hatta, 1981).

Os procedimentos de controle de vírus são, basicamente, preventivos. As principais medidas recomendadas incluem a eliminação das fontes de inóculo, a utilização de material vegetal sadio, a escolha de áreas e épocas de plantio, o controle de vetores e o uso de cultivares resistentes ou tolerantes. Fontes de resistência ao TSWV em algumas espécies de pimenta e tomate (*Solanum lycopersicum*) estão sendo utilizadas em programas de melhoramento genético no Brasil e no mundo. Na última década, vários genes de resistência e seus correspondentes de avirulência têm sido estudados. No Brasil, foram pesquisadas populações derivadas da cultivar Stevens, obtidas a partir de cruzamentos com *S. peruvianum*, contendo o gene *Sw-5*, que confere resistência ampla em tomateiro aos tospovírus: TSWV, GRSV e TCSV (Boiteux e Giordano, 1993; Spassova *et al.*, 2001). Plantas que expressam o gene *Sw-5* restringem a infecção sistêmica do vírus, e as folhas inoculadas apresentam sintomas localizados, como lesões locais ou reações de hipersensibilidade (RH) (Brommonschenkel *et al.*, 2000).

Assim, como em plantas de tomate, plantas de pimenta (*Capsicum chinense*) também expressam um gene de resistência, o gene *Tsw*, especialmente, em *Capsicum chinense* “PI 159236” e “PI 152225” (Boiteux *et al.*, 1993). Diferente do gene *Sw-5*, o gene *Tsw* confere resistência apenas ao TSWV, conferindo uma resistência espécie-específica (Boiteux, 1995).

Estudos que visam compreender a interação entre genes de resistência a TSWV e seu componente de avirulência têm sido realizados com estes dois genes: *Sw-5* e *Tsw*. No caso do gene *Tsw*, a expressão do gene de avirulência parece estar localizada no componente S, que contém os genes *NS_S* e *N* (Hoffmann *et al.*, 2001; Margaria *et al.*, 2007; Lovato *et al.*, 2008). Lovato *et al.* (2008) observaram que a proteína N elicitou a resposta de RH em plantas de *C. chinense*, enquanto que Margaria *et al.* (2007), por meio de análises de sequências, propuseram que a proteína *NS_S* seria o fator de avirulência.

Hoffmann *et al.* (2001) verificaram, por meio do uso de isolados recombinantes, que o gene de avirulência da interação TSWV/*Sw-5* está localizado no componente M, que contém o gene *NS_M*; e o precursor das glicoproteínas *G_C* e *G_N* que recobrem o envelope lipídico e são responsáveis pela interação tospovírus/inseto vetor (Bandla *et al.*, 1998). López *et al.* (2011), por meio da comparação de nucleotídeos e sequências de aminoácidos, de isolados selvagens de TSWV e isolados capazes de superar a resistência, sugeriram que a resistência conferida pelo gene *Sw-5* está relacionada à proteína de movimento *NS_M*.

Recentemente, isolados de TSWV com a habilidade para superar a resistência conferida pelo gene *Sw-5* foram relatados em cultivos de tomates resistentes na Espanha (isolado GRAU) (Aramburu e Marti, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005; López *et al.*, 2011) e África do Sul (isolado JF-1) (Thompson e Van Zijl, 1996). Para o gene *Tsw* em *Capsicum* spp., já se tem relatos de alguns isolados capazes de superar a resistência conferida pelo gene (Margaria *et al.*, 2007). A capacidade de multiplicação no inseto vetor e a composição de seu genoma tripartido podem, potencialmente, conferir aos vírus da família *Bunyaviridae* a geração de novos isolados, a partir de eventos de permuta genética (*reassortment*) de segmentos inteiros de seu genoma (Hoffmann *et al.*, 2001).

Visando aprofundar os conhecimentos sobre a interação dos genes de resistência mencionados e os genes virais de tospovírus, este trabalho foi elaborado seguindo três linhas de pesquisas. A primeira linha objetivou determinar a sequência de nucleotídeos do gene da *NS_S* de duas espécies de tospovírus com ocorrência no Brasil. A segunda, visou elucidar os domínios da proteína N de TCSV e TSWV potencialmente envolvidos com a resposta de hipersensibilidade em plantas de *Capsicum chinense* e a terceira, procurou investigar o possível gene de avirulência do TSWV responsável pela interação com o gene *Sw-5* e pela indução de reações do tipo RH em plantas resistentes.

Na primeira parte do trabalho, descrita no Capítulo 2, foram determinadas as sequências completas de nucleotídeos do gene *NS_S* de GRSV e ZLCV. Em seguida as sequências foram comparadas com outras sequências *NS_S* de tospovírus disponíveis no banco de dados permitindo a construção de árvores filogenéticas.

A segunda parte do trabalho, descrita no Capítulo 3, teve como objetivo estudar os domínios da proteína do nucleocapsídeo (N) de TSWV responsável pela indução de reação de hipersensibilidade em genótipos de pimenta, para isso foram construídas quimeras com recombinações entre as porções N e C terminal, utilizando os genes *N* de TSWV e TCSV, empregando como ferramenta o vetor de expressão pGreenII 62-K .

Na terceira parte deste trabalho, descrita no Capítulo 4, foi identificado o possível gene de avirulência do TSWV que interage com o gene de resistência *Sw-5* de tomate. Plantas de *Nicotiana benthamiana* que expressam o gene *Sw-5b* foram agroinfiltradas com os vetores de expressão pEAQ-HT Gateway e o vetor pGR107 (PVX – *Potato virus X*), contendo os genes do TSWV.

O entendimento dos mecanismos de interação e superação de genes de resistência em tomate e pimenta contra tospovírus poderá proporcionar o uso de estratégias mais amplas e

duradouras de controle desses patógenos a serem desenvolvidos por Institutos de Pesquisas Governamentais.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Família *Bunyaviridae* e o gênero *Tospovirus*

A doença do tomateiro denominada “*spotted wilt*” foi primeiramente relatada em 1915 na Austrália (Brittlebank, 1919) e mais tarde, Samuel *et al.* (1930) diagnosticaram o agente causal da doença como sendo o vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Cerca de cinquenta anos depois, Milne e Francki (1984) verificaram similaridade entre o TSWV e os vírus da família *Bunyaviridae*, composta por vírus com genoma de RNA negativo, mas que infectam animais.

A família *Bunyaviridae* compreende quatro gêneros constituídos por vírus que infectam vertebrados: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus* e o gênero *Tospovirus*, cujos membros infectam plantas (Fauquet *et al.*, 2005). Os membros pertencentes a essa família são transmitidos por vetores artrópodes, com exceção dos hantavírus que são transmitidos por roedores (Schimaljohn e Hooper, 2001).

2. Classificação dos tospovírus

Durante seis décadas, o TSWV foi o único membro do gênero *Tospovirus*, primeiramente denominado Tomato spotted wilt virus group (Matthews, 1979). A descoberta de um segundo tospovírus, o *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (Law e Moyer, 1990; de Haan *et al.*, 1992), foi seguida pela descrição de um grande número de tospovírus em diferentes partes do mundo.

O conceito de espécie, proposto por van Regenmortel (1990), passou a ser aceito pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), a partir de 1991, que endossou a seguinte definição: “Uma espécie viral é uma classe politética de vírus que constitui uma linhagem de replicação e ocupa um nicho ecológico particular” (van Regenmortel, 1990). O ICTV adota uma terminologia universal de nomenclatura que estabelece que a espécie viral receba um nome composto, preferencialmente incluindo o hospedeiro, o sintoma típico, a localidade onde o vírus foi isolado pela primeira vez e o termo “vírus”, que deve ser a última palavra do nome (Fauquet *et al.*, 2005).

O critério de diferenciação de espécies do gênero *Tospovirus*, proposto por de Avila *et al.* (1993), baseou-se na divergência da sequência de aminoácidos da proteína do nucleocapsídeo (N). Os autores observaram uma alta divergência de sequências entre os isolados BR-03 e SA-05, pertencentes ao sorogrupo II, considerando como espécies distintas dentro do gênero *Tospovirus*, propondo os nomes *Tomato chlorotic spot virus* e *Groundnut ringspot virus*, respectivamente.

Atualmente, o ICTV reconhece 23 espécies definitivas (Quadro 1.1) e tentativas (Quadro 1.2) de tospovírus (Fauquet *et al.*, 2005; de Oliveira *et al.*, 2011; Seepiban *et al.*, 2011; Hassani-Mehraban *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). O círculo de hospedeiros, as espécies de insetos vetores e a especificidade vírus/vetor são importantes características biológicas para a separação das espécies de tospovírus, em conjunto com as propriedades sorológicas e moleculares como a identidade da sequência de aminoácidos da proteína do nucleocapsídeo, inferior a 90% (de Avila *et al.*, 1993; Goldbach e Kuo, 1996). A classificação em nível de gênero é feita com base na organização do genoma, na morfologia do vírion e na especificidade da transmissão do vírus por espécies de tripes.

Alguns autores sugerem a inclusão de alguns parâmetros na classificação taxonômica dos tospovírus, como comparações entre as sequências de aminoácidos da NS_M e NS_S (Silva *et al.*, 2001); da região intergênica do RNA M e do precursor das glicoproteínas (Lovato *et al.*, 2004); e também da polimerase (Bertran *et al.*, 2011), sendo que todas, provavelmente, refletem as alterações ocorridas e que estão relacionadas, diretamente, com a evolução das espécies de tospovírus. A partir da proposição por Silva *et al.* (2001), os tospovírus são geralmente agrupados em dois grupos: Americano e Eurasiano, com base na prevalência geográfica e na análise filogenética das proteínas N e NS_M.

Quadro 1.1: Espécies de tospovírus reconhecidas pelo ICTV, espécies de tripes vetores e distribuição geográfica (Adaptado de Pappu *et al.*, 2009 e Hassani-Mehraban, 2011).

Espécie de tospovírus	Distribuição geográfica	Vetor
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Cinco continentes	<i>Frankliniella bispinosa</i> <i>F. cephalica</i> <i>F. fusca</i> <i>F. intonsa</i> <i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i> <i>Thrips setosus</i> <i>T. tabaci</i>
<i>Groundnut ringspot virus</i> (GRSV)	América do Sul e África do Sul	<i>F. intonsa</i> <i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i>
<i>Tomato chlorotic spot virus</i> (TCSV)	América do Sul	<i>F. occidentalis</i> <i>F. intonsa</i> <i>F. schultzei</i>
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> (CSNV)	América do Sul (Brasil), Ásia (Japão) e Europa	<i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i> <i>F. gemina</i>
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> (ZLCV)	América do Sul (Brasil)	<i>F. zucchini</i>
<i>Impatiens necrotic spot virus</i> (INSV)	EUA, Europa, África e Austrália	<i>F. occidentalis</i> <i>F. intonsa</i> <i>F. schultzei</i>
<i>Groundnut bud necrosis virus</i> (GBNV)	Ásia	<i>T. palmi</i> <i>F. schultzei</i> <i>Scirtothrips dorsalis</i>
<i>Peanut chlorotic fan-spot virus</i> (PCFV)	Ásia (Taiwan)	<i>S. dorsalis</i>
<i>Watermelon bud necrosis virus</i> (WBNV)	Ásia (Índia)	<i>T. palmi</i>
<i>Watermelon silver mottle virus</i> (WSMoV)	Ásia (Japão e Indonésia)	<i>T. palmi</i>

Quadro 1.2: Espécies tentativas de tospovírus, espécies de tripes vetores e distribuição geográfica (Adaptado de Pappu *et al.*, 2009 e Hassani-Mehraban, 2011).

Espécie de tospovírus	Distribuição geográfica	Vetor
Melon severe mosaic virus (MeSMV)	México	Desconhecido
Alstroemeria necrotic streak virus (ANSV)	Colômbia	<i>F. occidentalis</i>
Polygonum ringspot virus (PoRSV)	Itália	<i>Dictyothrips betae</i>
Iris yellow spot virus (IYSV)	Cinco continentes	<i>T. tabaci</i>
Tomato yellow ring virus (TYRV)	Irã	<i>T. tabaci</i>
Melon yellow spot virus (MYSV)	Ásia (Taiwan)	<i>T. palmi</i>
Tomato zonate spot virus (TZSV)	Ásia (China)	Desconhecido
Calla lily chlorotic spot virus (CCSV)	Ásia (Taiwan)	<i>T. palmi</i>
Capsicum chlorosis virus (CaCV)	Austrália, Tailândia e Índia	<i>Ceratothripoides claratis</i> <i>T. palmi</i>
Watermelon bud necrosis virus (WBNV)	Ásia (Índia)	<i>T. palmi</i>
Peanut yellow spot virus (PYSV)	Ásia (Índia)	<i>S. dorsalis</i>
Tomato necrotic ring virus (TNRV)	Ásia (Tailândia)	<i>C. claratis</i> <i>T. palmi</i>
Bean necrotic mosaic virus (BeNMV)	Brasil	Desconhecido
Soybean vein necrosis virus (SVNV)	Estados Unidos	Desconhecido

3. Organização genômica

O gênero *Tospovirus* é formado por vírus que apresentam uma partícula pleomórfica (80-120 nanômetros; Figura 1.1), envolta por uma membrana lipídica com projeções formadas por duas glicoproteínas e genoma contendo três segmentos de RNA: L (*Large*), M (*Medium*), e S (*Small*) (de Haan *et al.*, 1991). Os três segmentos genômicos possuem uma sequência nucleotídica complementar nas extremidades 5' e 3', sendo altamente conservados entre vírus de um mesmo gênero. Esta complementaridade nucleotídica permite que ocorra o pareamento de bases das duas extremidades terminais, formando estruturas estáveis na forma pseudo-circular, também conhecido como “cabo de panela” (Peters *et al.*, 1991).

O segmento L apresenta senso negativo, uma única fase de leitura aberta (ORF) e codifica uma proteína L (de Haan *et al.*, 1991), que é a provável RNA polimerase RNA dependente (RdRp), que está presente na partícula viral (van Poelwijk *et al.*, 1996). A proteína L apresenta atividades enzimáticas, como polimerase e endonuclease e está envolvida na transcrição e replicação viral (Adkins *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 2003). É possível que a proteína L contenha domínios adicionais que exerçam papéis em outros processos, como determinantes na gama de hospedeiros, já que a proteína apresenta tamanhos diferenciados entre os gêneros da família *Bunyaviridae* (Snippe, 2006).

O segmento M, ambisenso, apresenta duas ORFs, uma no sentido viral, que codifica a proteína de movimento não estrutural (NS_M), e outra no sentido complementar, codificando um precursor para as glicoproteínas G_N (G1) com localização aminoterminal e G_C (G2) carboxi terminal, ambas associadas à membrana lipídica (Kormelink *et al.*, 1992a). As glicoproteínas atuam na formação da partícula viral e na adesão às novas células-alvo (Schmaljohn e Nichol, 2007). A análise da sequência de aminoácidos do precursor da glicoproteína do TSWV revelou a presença de motivo RGD (Arg-Gly-Asp), um possível sítio de ligação do vírus ao receptor presente nas células do vetor, localizado na proteína G_N (Kormelink *et al.*, 1992a; Law *et al.*, 1992). As glicoproteínas presentes no envelope viral são os principais determinantes na transmissão do vírus pelo inseto vetor e na especificidade (Wijkamp, 1995), elas também interagem com os receptores presentes na superfície do epitélio do intestino médio do inseto, que é o primeiro sítio de infecção viral (Ullman *et al.*, 1992b; Wijkamp *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 2002), mediando a aquisição do vírus pelos tripes (Bandla *et al.*, 1998).

A proteína NS_M é expressa durante os estádios iniciais de uma infecção dos tecidos vegetais por tospovírus, antes mesmo do aparecimento das partículas virais, formando

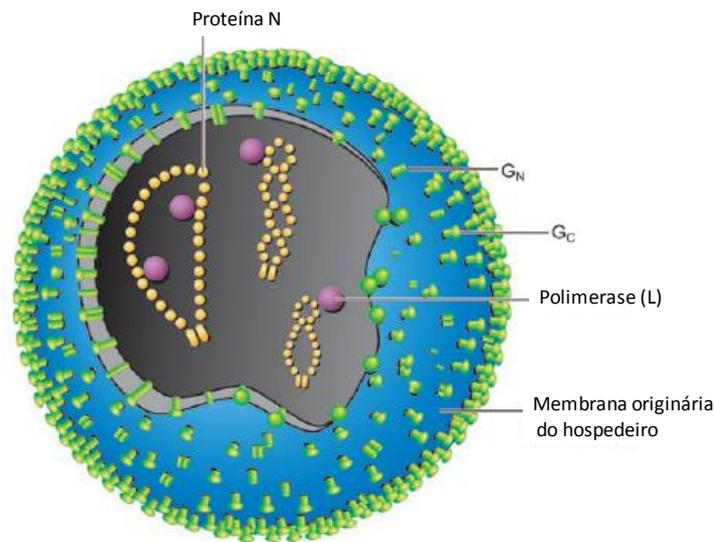
estruturas tubulares que se estendem dos plasmodesmas a novas células infectadas. A expressão transiente da proteína NS_M em protoplastos também conduz à formação de estruturas tubulares, mesmo na ausência de outras proteínas virais (Kormelink *et al.*, 1994; Storms *et al.*, 1995). Por essas razões, tem sido sugerido o envolvimento da proteína no movimento a curta distância da ribonucleoproteína (RNP) não envelopada de célula-a-célula (Storms *et al.*, 1995, 1998). Acredita-se que a proteína NS_M dos bunyavírus desempenhe um papel na montagem da partícula viral (Shi *et al.*, 2006), pois ela é encontrada em estruturas tubulares associadas ao Golgi, em células infectadas, onde está ocorrendo a morfogênese do vírus (Fontana *et al.*, 2008). Nos Phlebovirus, a NS_M desempenha um papel acessório na regulação da morte celular programada (Won *et al.*, 2007).

O segmento S, ambisense, codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) no sentido viral complementar, responsável pela proteção do RNA viral, e também a proteína não estrutural (NS_S) no sentido viral, que apresenta atividade supressora de silenciamento de RNA demonstrada para o TSWV (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003) e recentemente para o GBNV (Goswami *et al.*, 2011). A proteína NS_S é encontrada dispersa no citoplasma ou na forma de corpos de inclusão fibrilar nas células de tripes e tecidos foliares infectados (Ullman *et al.*, 1993). Uma correlação entre a quantidade da expressão da proteína e a virulência dos isolados de tospovírus foi observada, relacionando a proteína com a severidade dos sintomas em tecidos foliares (Kormelink *et al.*, 1991). Lokesh *et al.* (2010) observaram que a NS_S pode agir como um supressor do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) por meio da remoção do 5' fósforo do dsRNA, que é o substrato da Dicer (enzima responsável por clivar dsRNA em pequenos RNAs de tamanhos uniformes (siRNA)). A Dicer não reconhece o dsRNA desfosforilado (Nykanen *et al.*, 2001) e portanto a remoção do 5' fósforo pela NS_S poderia bloquear a via do PTGS (Lokesh *et al.*, 2010). Outra função da NS_S observada por Lokesh *et al.* (2010) foi a atividade de ATPase, como o ATP é requerido para a via do PTGS pode ocorrer a supressão da mesma.

A proteína do nucleocapsídeo (N), quando comparada com as outras proteínas dos tospovírus, é a menos conservada, apresentando de 15 a 25% de identidade de sequência e é usada na classificação taxonômica dos mesmos. Ela é uma proteína multifuncional, sendo requerida em vários processos, como a encapsidação do RNA viral, transcrição e replicação do genoma viral. Múltiplos domínios de ligação do RNA, que se encontram dentro da proteína, têm sido caracterizados (Richmond *et al.*, 1998). Um trabalho recente mostrou que a proteína N interage com as proteínas G_N e G_C, facilitando a formação de partículas virais

maduras e envelopadas (Ribeiro *et al.*, 2008), mostrando o papel primário da proteína na encapsidação. Lovato *et al.* (2008) mostraram que a proteína N do TSWV induz a morte celular programada em plantas de *Capsicum chinense*, sugerindo que a proteína N seja o fator de avirulência para o gene *Tsw* (Lovato *et al.*, 2008).

(A)



(B)

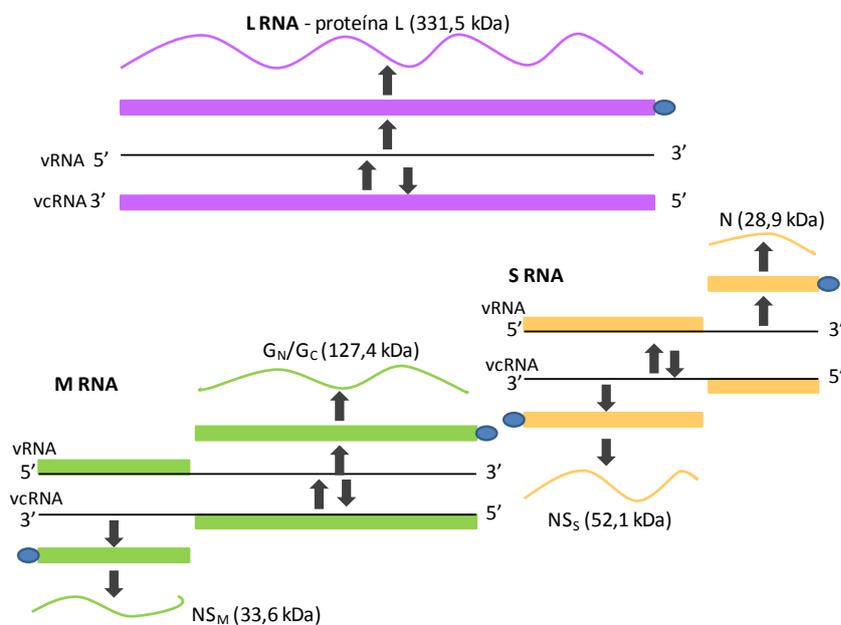


Figura 1.1: Estrutura da partícula viral e organização genômica. (A) Ilustração da estrutura da partícula viral. A membrana lipídica, oriunda da célula hospedeira, projetando em sua superfície as glicoproteínas G_N e G_C . Internamente, os três RNAs genômicos virais associados com a proteína N formando a ribonucleoproteína (RNP) em associação com a RNA polimerase RNA dependente. (Ilustração de D. E. Ullman e Eileen J. Rendahl, Whitfield *et al.*, 2005). (B) Organização genômica e estratégia de expressão do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). O genoma é composto por três segmentos de RNA: L, M e S. O RNA L codifica a polimerase viral; o RNA M codifica a proteína não estrutural NS_M e o precursor das glicoproteínas G_N e G_C e o RNA S codifica a proteína NS_S e a proteína N do nucleocapsídeo. Os pequenos círculos em azul na região 5' de cada transcrito representam a sequência *cap* adquirida durante o processo de *cap-snatching*.

4. Transmissão e ciclo de infecção dos tospovírus

Os vírus deste gênero são transmitidos de maneira circulativa/propagativa por várias espécies de tripes (Wijkamp *et al.*, 1995). No Brasil, foram encontradas as seguintes espécies de tripes vetores de tospovírus: *Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei* (Nagata *et al.*, 1999b), *F. zucchini* (Nakahara e Monteiro, 1999), *Thrips tabaci* e *T. palmi* (Nagata *et al.*, 1999b).

A transmissão do tospovírus pelo tripe só ocorre se o vetor adquirir o vírus no estágio de larva, especialmente, no primeiro estágio (Ullman *et al.*, 1992a e b). Para que o vírus seja transmitido com sucesso, ele precisa passar por diversas barreiras dentro do corpo do inseto. Os primeiros sinais de infecção em tripes por tospovírus foram visualizados em células epiteliais do intestino médio, principalmente na região anterior, posteriormente, o vírus se espalha pelos tecidos musculares do intestino médio. No estágio adulto, o vírus foi detectado nos tecidos musculares viscerais e no epitélio do intestino médio e, após 72 horas de aquisição, o vírus foi detectado nas glândulas salivares e nos ligamentos que conectam o intestino médio às glândulas salivares (Nagata *et al.*, 1999a, 2002). Apesar da provável existência de barreiras à circulação do vírus no corpo do tripe, presume-se que a entrada do vírus pelas células do intestino do inseto é mediada por uma interação entre receptores de membrana do intestino médio e proteínas do RNA M do TSWV, semelhante ao que ocorre com outros membros da família *Bunyaviridae* (Bandla *et al.*, 1998). As glicoproteínas são as prováveis proteínas virais com função de adesão às células dos vetores, elas exercem importante papel na infecção do inseto vetor e são, provavelmente, os primeiros componentes virais que interagem com um receptor celular presente no intestino médio do tripe (Ullman *et al.*, 1992; Wijkamp *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 2002). Sin *et al.* (2005) demonstraram que as glicoproteínas do TSWV são necessárias para a infecção de *F. occidentalis* pelo vírus e que um único ponto de mutação na ORF da glicoproteína impede a transmissão do vírus pelo inseto. Entretanto, essa alteração na ORF da glicoproteína não compromete a habilidade do vírus de infectar plantas. Uma proteína de 50 KDa foi identificada por Bandla *et al.* (1998) no intestino médio de *F. occidentalis* como uma candidata a receptora para o TSWV; os autores verificaram que a concentração do receptor celular varia de acordo com a idade do inseto, compatível com estudos que mostram que a aquisição do vírus é reduzida conforme a idade do vetor. Whitfield *et al.* (2008) verificaram que ao se usar uma forma solúvel da glicoproteína G_N (G_N-S), esta se liga ao intestino médio do tripe e reduz em até 8 vezes a porcentagem de insetos adultos transmissores de TSWV. Esse resultado demonstrou que a

transmissão de TSWV por tripes pode ser reduzida com o uso de uma glicoproteína viral exógena, demonstrando também que esta é reconhecida por um receptor celular do inseto.

O tripe transmissor, ao se alimentar em uma planta sadia, introduz as partículas virais na célula vegetal. O envelope viral é removido e as ribonucleoproteínas (RNPs) são liberadas no citoplasma (Figura 1.2). Após a liberação do material genético no citoplasma, o RNA viral é transcrito pela polimerase viral. A transcrição é iniciada pelo processo de *cap-snatching*, em que sequências clivadas (12 a 20 nucleotídeos) na região 5' dos RNAs mensageiros do hospedeiro atuam como iniciadores da síntese de RNA viral (Kormelink *et al.*, 1992b; Duijsings *et al.*, 2001). Após a extensão da polimerase, o RNA viral mensageiro é traduzido. A tradução resulta na produção das proteínas L, N e do precursor da glicoproteína (Kormelink *et al.*, 1992b). À medida que avança o processo de infecção, ocorre aumento da concentração da proteína N e a polimerase viral passa a mediar à replicação do vírus, produzindo várias cópias do RNA genômico. Uma maior produção das proteínas NS_S e NS_M ocorre em uma segunda tradução, completando a síntese das proteínas virais (Kormelink *et al.*, 1992; Ribeiro, 2007).

O RNA viral genômico recém sintetizado se associa com a proteína N e com a polimerase L, formando as RNPs, que se associam a proteína NS_M, e são transportados para células vizinhas através dos plasmodesmas, propagando a infecção. Enquanto isso, as glicoproteínas G_N e G_C são glicosiladas e processadas no retículo endoplasmático rugoso enquanto que os RNPs acumulam-se nas membranas do complexo de Golgi (Kikkert *et al.*, 1999) (Figura 1.3). Em seguida, as glicoproteínas são modificadas no complexo de Golgi. Os RNPs, que se localizam próximos ao local onde se encontram as glicoproteínas, são envolvidos (*wrapping*) por essas glicoproteínas, originando novas partículas virais duplamente envelopadas (DEVs) (Kikkert *et al.*, 1999, Ribeiro *et al.*, 2008). Em um estágio de maturação tardia, as DEVs se fusionam umas com as outras, levando à formação de vesículas largas que contêm partículas virais com um envelope (SEVs). As novas partículas virais se acumulam no compartimento celular até serem mais tarde adquiridas pelo inseto vetor.

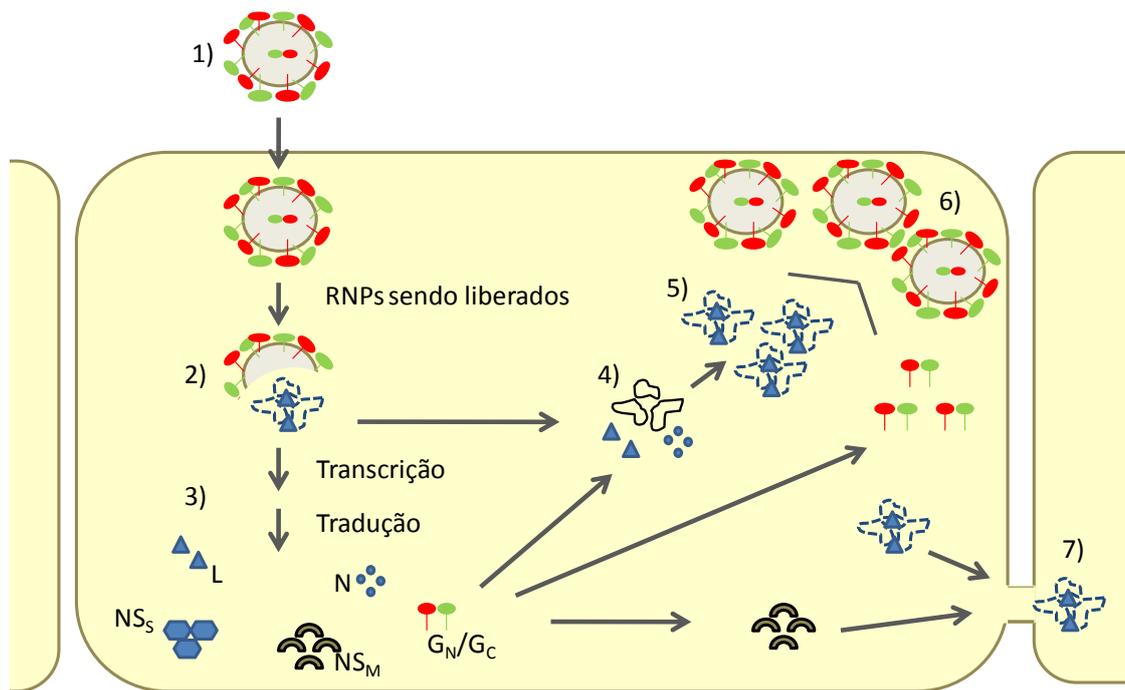


Figura 1.2: Ciclo de infecção do TSWV na célula vegetal. RNPs – ribonucleoproteínas; L – polimerase; NS_S – proteína supressora de silenciamento gênico; NS_M – proteína de movimento; N – nucleoproteína; G_N e G_C – glicoproteínas; **1-** Entrada do vírus TSWV na célula hospedeira; **2-** Remoção do envelope viral e liberação dos RNPs; **3-** Tradução resultando na produção das proteínas N, L, G_N/G_C, NS_M e NS_S; **4-** Formação dos RNPs; **5-** RNPs; **6-** RNPs envolvidos pelas glicoproteínas originando novas partículas virais; **7-** Associação dos RNPs com a NS_M responsável pelo movimento viral através dos plasmodesmas. (Adaptação da ilustração de Ribeiro, 2007)

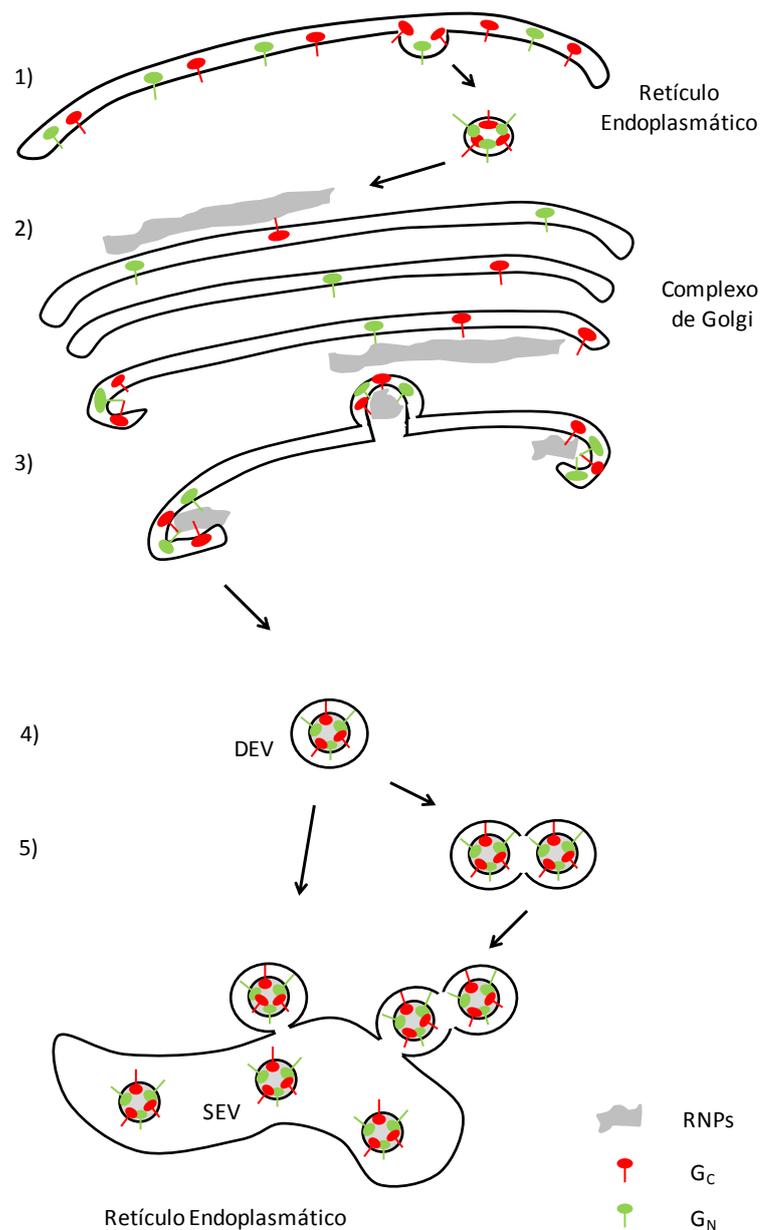


Figura 1.3: Representação esquemática do mecanismo de montagem da partícula viral.

1- Glicoproteínas G_N e G_C sendo processadas no retículo endoplasmático (RE); **2-** Acúmulo das RNPs nas membranas do complexo de Golgi; **3-** Envolvimento dos RNPs pelas glicoproteínas presentes nas membranas do Golgi; **4-** Formação das partículas virais duplamente envelopadas (DEVs); **5-** Formação de vesículas devido à fusão ocorrida entre as DEVs, levando à formação de vesículas largas que contêm partículas virais com um envelope (SEVs). (Adaptação da ilustração de Ribeiro, 2007).

5. Ocorrência de Tospovírus

O *Tomato spotted wilt virus* é considerado a espécie-tipo do gênero *Tospovirus* e estima-se que isolados deste vírus infectem mais de 900 espécies de plantas dentro de 90 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas, em todo o mundo, causando grandes danos e perdas (Peters, 1998; Parrela *et al.*, 2003), enquanto isolados de INSV infectam, aproximadamente, 300 espécies de plantas pertencentes a 85 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Pappu *et al.*, 2009).

Os principais sintomas observados nas plantas infectadas são: mosaico, bronzeamento nas folhas, surgimento de anéis cloróticos e necróticos nas folhas e nos frutos, nanismo e necrose das hastes e das folhas (Pozzer *et al.*, 1996). Os sintomas causados pela doença variam conforme a espécie, o isolado, o hospedeiro e as condições ambientais.

Os tospovírus estão distribuídos nos cinco continentes. O continente asiático apresenta a maior diversidade de tospovírus, seguido pelo continente americano. Pelo menos 14 espécies já foram identificadas, infectando culturas de importância econômica no continente asiático. Tomate, pimentão, cebola, alface e repolho estão entre as principais culturas afetadas pelo TSWV, seguido pelo *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) que causa perdas em cultivos no centro-leste e sul da Ásia (Lebas e Ochoa-Corona, 2007). Além do TSWV e INSV, o *Tomato yellow ring virus* (TYRV), caracterizado em 2005, foi encontrado no Irã, em cultivos de batata, soja, tomate e ornamentais, com possibilidades de se tornar um grande problema econômico no futuro (Hassani-Mehraban *et al.*, 2005). O *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) é o vírus mais importante em aspectos econômicos na Ásia, causando perdas de US \$89 milhões em cultivos de amendoim, batata, tomate e soja nas regiões produtoras da China, Índia, Irã, Nepal, Sri Lanka e Tailândia (Reddy *et al.*, 1995). Na Índia, relatou-se perdas na produção de amendoim causadas por GBNV de 70-90% (Singh e Srivatava (1995) citado por Pappu *et al.*, 2009). Outra espécie importante de tospovírus é o *Watermelon bud necrosis virus* (WBNV), que pode chegar a causar 100% de perdas nos cultivos de cucurbitáceas na Índia (Jain *et al.*, 2007).

No continente africano, o TSWV causa danos nas culturas de tomate, fumo, pimentão e batata. Além do TSWV, outros três tospovírus ocorrem no continente africano: GRSV, infectando soja, Iris yellow spot virus (IYSV) em cebola e, recentemente, o *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) foi relatado no Egito (El-Wahab *et al.*, 2008 citado por Pappu *et al.*, 2009).

A primeira descrição da doença causada pelo TSWV foi feita no continente australiano, em 1915 (Brittlebank, 1919). Desde então, o TSWV continua sendo o vírus que mais causa danos em hortaliças (batata, pimentão, alface e tomate) e ornamentais (calêndula e dália) no continente. Por mais de 80 anos, nenhuma outra doença causada por tospovírus foi relatada no continente australiano (Mc Michael *et al.*, 2002), mas, recentemente, três tospovírus foram encontrados: o Calla lily chlorotic spot virus (CCSV), o IYSV (Coutts *et al.*, 2004) e um tospovírus ainda não caracterizado, o qual foi encontrado em uma orquídea nativa (*Pterostylis* sp.) no sudoeste da Austrália (Gibbs *et al.*, 2000).

Na Europa, o TSWV e o INSV são duas espécies bem estabelecidas. O TSWV foi reportado, pela primeira vez, em 1929, infectando cereja ornamental (Smith, 1932). O INSV foi relatado em 1991, infectando plantas ornamentais (flores de corte e plantas em vaso) (Peters *et al.*, 1996). Outras espécies encontradas na Europa são o IYSV e CSNV (Pappu *et al.*, 2009).

No Brasil, Silberschmidt (1937) relatou a doença causada por TSWV pela primeira vez, conhecida como vira-cabeça, infectando fumo.

O TSWV provoca grandes perdas econômicas em hortaliças no país. Em 1995, Nagata *et al.* realizaram um levantamento da ocorrência de isolados de tospovírus em vários Estados brasileiros e relataram que nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul predominavam as espécies *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV), enquanto no Distrito Federal e no Estado do Paraná predominava a espécie TSWV. O Brasil apresenta uma grande diversidade de tospovírus, além das espécies TSWV, TCSV e GRSV foram identificadas as espécies *Iris yellow spot virus* (IYSV) em plantas de cebola, na região nordeste do país, com perdas de 100% da produção (Pozzer *et al.*, 1999); *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) em plantas de crisântemo e tomate no Rio de Janeiro (Brioso *et al.*, 2004) e tomate em Viçosa - Minas Gerais (Nagata *et al.*, 1998); e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) em campos experimentais de abóbora em São Paulo (Pozzer *et al.*, 1996; Resende *et al.*, 1997; Bezerra *et al.*, 1999) e em pepino no Distrito Federal (Nagata *et al.*, 1998).

6. Controle dos tospovírus

O manejo de tospovírus é difícil devido ao amplo círculo de hospedeiras e devido ao ineficiente controle químico desses insetos. Várias práticas culturais têm sido recomendadas para um controle efetivo do TSWV como o combate ao tripses vetor, mediante o uso de

inseticidas químicos, uso de agentes de controle biológico e utilização de plantas hospedeiras resistentes.

O uso de inseticidas para controlar o tripses tem se mostrado um método de baixa eficiência, não reduzindo, de maneira significativa, a incidência de TSWV em diferentes cultivos (Cho *et al.*, 1989). O método mais eficiente tem sido o uso de cultivares resistentes ao TSWV. Algumas espécies de *Solanum* possuem resistência natural. A maioria das fontes de resistência identificadas apresenta pouco interesse para uso em programas de melhoramento, por serem do tipo isolado específico (Stevens *et al.*, 1992) e de natureza poligênica (Paterson *et al.*, 1989). A primeira fonte de resistência natural foi identificada em *Solanum peruvianum*, o qual apresentou elevado nível de resistência a isolados de TSWV (Stevens *et al.*, 1992). No Brasil, foram pesquisadas populações derivadas do cultivar 'Stevens', originadas de cruzamentos entre *S. peruvianum* e *S. esculentum*, obtidas na África do Sul (van Zijl *et al.*, 1986; Stevens *et al.*, 1992). Essa resistência introduzida na cultivar Stevens é mediada pelo gene *Sw-5*, que confere resistência ampla aos tospovírus: TSWV, GRSV e TCSV (Boiteux e Giordano, 1993; Spassova *et al.*, 2001). Plantas que expressam o gene *Sw-5* restringem a infecção sistêmica do vírus e as folhas inoculadas produzem uma reação do tipo hipersensibilidade (RH) (Stevens *et al.*, 1992).

Cultivares de tomates comerciais, que expressam o gene de resistência *Sw-5*, tem sido usadas em vários países: África do Sul, Espanha, Itália, Austrália e Estados Unidos (Roggero *et al.*, 2002; Sivpasard e Gubba, 2011). No Brasil, devido aos danos econômicos causados por tospovírus, em áreas de tomate para processamento industrial, a Embrapa Hortaliças, em parceria com o IPA (Instituto Pernambucano de Pesquisa Agropecuária), desenvolveu a cultivar de tomate para processamento industrial 'Viradoro', resistente aos tospovírus TSWV, TCSV e GRSV (Giordano *et al.*, 2000). A cultivar 'Viradoro' teve origem a partir de cruzamentos realizados entre os cultivares 'IPA-5' (resistente a altas temperaturas, aos fungos verticillium, fusarium, stemphylium e ao nematóide meloidogyne) e 'TSW-10' que contém o gene *Sw-5* que confere resistência a tospovírus, além dos genes *Sm* que confere resistência ao stemphylium e o gene *Ve* ao verticillium) (Giordano *et al.*, 2000).

O surgimento de isolados com capacidade de superar os genes de resistência tem sido descrito na literatura. Em 1993 na África do Sul, foram encontradas plantas de tomate que apresentavam o gene *Sw-5*, sendo infectadas pelo TSWV isolado JF1, capaz de quebrar a resistência conferida pelo gene *Sw-5*. Entretanto, esta variante viral não se estabeleceu e também não se disseminou para outras áreas de cultivo, ficando restrita ao campo de origem

(Thompson e van Zijl, 1996). Na primavera de 2002, um novo isolado do TSWV, conhecido como GRAU, foi encontrado, infectando plantas de tomate em um campo na Província de Barcelona, na Espanha, sendo que as plantas apresentavam sintomas típicos de TSWV, apesar de também possuírem o gene *Sw-5* (Aramburu e Martí, 2003). Em contraste ao que ocorreu na África do Sul, o GRAU se disseminou para outras áreas e foi encontrado infectando plantas de tomate próximas a cultivos de pimenta, a 4 Km de distância do campo de origem (Aramburu e Martí, 2003). Em adição a esses países, também já existem relatos de quebra de resistência do gene *Sw-5* no Havaí (Canady *et al.*, 2001; Gordillo *et al.*, 2008) e na Itália (Roggero *et al.*, 2002; Ciuffo *et al.*, 2005; Zaccardelli *et al.*, 2008). No Brasil, ainda não existem relatos de quebra de resistência em cultivares de tomate por tospovírus.

O gene *Sw-5* foi mapeado ao longo do cromossomo 9 (Chague *et al.*, 1996; Stevens *et al.*, 1992, 1995) e a região que contém esse gene de resistência foi clonada e caracterizada (Brommonschenkel e Tanksley, 1997). Além disso, verificou-se que o gene *Sw-5* encontra-se dentro de um complexo, formado por cinco cópias do gene, nomeados *Sw-5a*, *Sw-5b*, *Sw-5c*, *Sw-5d* e *Sw-5e*. A eficiência conferida por cada cópia do gene aos tospovírus ainda não está completamente clara, mas análises das cópias em separado, realizadas em plantas transgênicas, indicaram que a expressão do *Sw-5b*, isoladamente, é suficiente para conferir o fenótipo de resistência (Spasova *et al.*, 2001).

López *et al.* (2011), por meio da comparação de nucleotídeos e sequências de aminoácidos entre isolados de TSWV do tipo selvagem e do tipo que quebram resistência, sugeriram que a resistência conferida pelo gene *Sw-5* pode ser superada pela substituição dos aminoácidos cisteína (C) pela tirosina (Y) na posição 118 (C118Y) ou pela substituição da treonina (T) pela asparagina (N) na posição 120, na proteína de movimento NS_M. Análises filogenéticas revelaram que a substituição C118Y ocorreu três vezes e de forma independente por evolução convergente (em condições ambientais similares, estruturas diferentes em diferentes grupos de organismos podem passar por modificações para exercer a mesma função), podendo ser uma adaptação para superar a resistência conferida pelo gene *Sw-5*, enquanto a substituição T120N ocorreu uma única vez. No entanto, essas conclusões foram indiretas, baseadas na comparação de sequências das proteínas virais, faltando a comprovação biológica da interação entre a proteína de movimento NS_M e o gene de resistência *Sw-5*.

O gene *Sw-5*, além de conferir resistência a espécies de tomate, também confere resistência a outras espécies da família *Solanaceae*, como o fumo (*Nicotiana tabacum*) e a berinjela (*Solanum melongena*) (Lau *et al.*, 2006).

Em *Capsicum*, foi relatado outro tipo de gene dominante de resistência *Tsw*, efetivo apenas contra isolados da espécie TSWV, especialmente, nos acessos de *Capsicum chinense* “PI159236” e “PI 152225” (Black *et al.*, 1991; Boiteux e de Avila, 1994; Boiteux, 1995). O gene *Tsw* não é efetivo contra TCSV e GRSV (Boiteux, 1995). Plantas, contendo o gene *Tsw*, produzem reações de hipersensibilidade (RH), isto significa que as plantas reagem contra a infecção viral, resultando em lesões necróticas no local da infecção (Boiteux e Avila, 1994). Esses genes de resistência têm sido introduzidos em cultivares de tomates comerciais (*Sw-5*) e cultivares de *Capsicum* spp (*Tsw*) e são empregados com sucesso em regiões produtoras dessas hortaliças no mundo, sendo que no Brasil não são utilizadas cultivares comerciais de *Capsicum* spp. contendo o gene *Tsw*. O primeiro relato de quebra de resistência para o gene *Tsw* foi observado apenas um ano após o seu uso, em 1999, na Itália e na Espanha (Garcia-Arenal e McDonald, 2003). Vários fatores podem ser responsáveis pela baixa durabilidade de resistência das plantas, e essa durabilidade pode estar relacionada à capacidade de evolução do vírus na superação da resistência, a qual está ligada ao número de mutações requeridas (Harrison, 2002; Ayme *et al.*, 2006, 2007; Tentchev *et al.*, 2011).

Lovato *et al.* (2008) observaram o efeito da expressão de três genes (*N*, *NS_M* e *NS_S*) de TSWV em *C. chinense* ‘PI 159236’, usando o vetor de *Potato virus X* (PVX). Os resultados obtidos, baseados na sintomatologia e alterações celulares observadas via microscopia de fluorescência, indicaram que o gene *N* é o provável gene de avirulência do TSWV, responsável pela indução de RH em *C. chinense* ‘PI 159236’ ou contribui como integrante de um complexo de proteínas que interagem com o produto do gene *Tsw* para que esta reação ocorra. Margaria *et al.* (2007) compilaram sequências do segmento do S RNA e das proteínas codificadas pelo mesmo, usando sequências depositadas em bancos de dados públicos de isolados selvagens e de isolados que quebram resistência, gerada pelo gene *Tsw*, e propuseram, com base nas diferenças gênicas, que a proteína *NS_S* seria o fator de avirulência. Os autores também caracterizaram dois isolados que quebram resistência e que apresentavam deleções na proteína *NS_S*. Esses autores puderam observar que a *NS_S* está envolvida na preservação dos sintomas em folhas novas, causados pela infecção do TSWV, evitando a recuperação da planta.

Jahn *et al.* (2000) amplificaram e mapearam o gene *Tsw*, que se encontra na porção distal do cromossomo 10, e também avaliaram a sua relação com gene *Sw-5*, por meio de estudos genéticos do TSWV. A capacidade do TSWV-A (isolado de uma cultivar de tomate que expressa o gene *Sw-5*) de superar a resistência gerada pelo gene *Tsw* em pimenta e pelo

gene *Sw-5* em tomate está localizada em diferentes segmentos do genoma do TSWV (Qiu e Moyer, 1999). A clonagem do gene *Tsw* e o seu sequenciamento estão sendo realizados na Universidade de Wageningen (Richard Kormelink, comunicação pessoal), mas os resultados ainda não estão disponíveis.

A diversidade de sequências de nucleotídeos entre os vírus de RNA é grande, especialmente, quando comparado com a evolução da maioria dos seres vivos. Os vírus de RNA apresentam taxas de mutação extremamente altas, por não possuírem um mecanismo de reparo (*proofreading*). Vírus com genomas segmentados têm a capacidade de expandir sua diversidade genética, seja por meio de acúmulo de mutações pontuais, seja mediante eventos de rearranjo genético ou permutação (Tsompana *et al.*, 2005). Domingo e Holland (1994) sugeriram que o mecanismo de rearranjo é o mais utilizado pelos vírus de genoma segmentado, visto que infecções mistas são muito comuns em isolados virais em condições de campo. Entretanto, o rearranjo pode ser considerado um evento raro, sua existência pode conferir uma vantagem seletiva, como a adaptação a novos hospedeiros e expansão da gama de hospedeiros. Estudos de rearranjo em bunyavirus mostraram ser úteis por permitirem o mapeamento de atributos e funções de segmentos específicos do RNA genômico. Na relação tospovírus/planta/inseto, a primeira evidência de rearranjo pode ser observada a partir da co-infecção de plantas com duas estirpes de TSWV, com subsequente observação da mistura de caracteres fenotípicos (Best e Gallus, 1955). Hoffmann *et al.* (2001) utilizaram um sistema genético viral para mapear os determinantes virais do TSWV responsáveis pela superação da resistência em plantas de tomate que expressam o gene de resistência *Sw-5*. A partir de um grupo de genótipos rearranjados, gerados de isolados de TSWV, os pesquisadores observaram que a habilidade de superar a resistência do gene *Sw-5* estava ligada ao segmento de M RNA. Webster *et al.* (2011) identificaram plantas de tomate, no sul da Flórida, infectadas com GRSV, com base na sorologia e na sequência do gene N, apresentando sintomas severos causados por tospovírus. Essa descoberta ampliou o conhecimento a respeito da distribuição do vírus, mostrando um aumento da disseminação desse vírus, indo além da América do Sul e África do Sul (de Avila *et al.*, 1990, 1993), para a América do Norte. A partir desse isolado, os autores puderam determinar e analisar o genoma completo do vírus, demonstrando que o isolado de GRSV, encontrado na Flórida, é na verdade um rearranjo formado pelo M RNA de TCSV e o S e L RNAs são oriundos do GRSV. O genótipo foi estabelecido como $L_G M_T S_G$ e foi verificado que ele é transmitido pelo tripses vetor e também não é capaz de superar a resistência em plantas de tomate que possuem o gene de resistência *Sw-5*.

7. Mecanismo de defesa das plantas contra patógenos

Genes de resistência presentes em plantas estão sempre associados a reações de defesa do organismo que se manifestam por meio de vários tipos de mecanismos de defesa desencadeados pela infecção do patógeno. A morte celular programada (PCD – *Programmed cell death*) constitui-se um desses tipos de manifestação de defesa contra infecções virais em diferentes hospedeiros e tem sido definida como uma cascata de eventos que conduzem a uma destruição controlada e organizada da célula (Lockshin e Zakeri, 2001). Estudos ultraestruturais, originalmente conduzidos por Kerr *et al.* (1972), levaram à descrição de duas formas distintas de morte celular: apoptose e necrose. A apoptose foi, inicialmente, descrita em termos morfológicos, sendo caracterizada pela diminuição celular, pela condensação e fragmentação nuclear e pela formação de corpos apoptóticos (Adrain e Martin, 2001). O termo apoptose foi especificamente usado para distinguir entre forma controlada de morte celular e necrose. Uma grande parte dos eventos bioquímicos que ocorrem na célula já foi esclarecida, como a destruição celular, que é conduzida pela ativação de uma família de proteases conhecidas como caspases (Wolf e Green, 1999). A ativação das caspases ocorre por meio de receptores extrínsecos, ou, alternativamente, por vias intrínsecas, controladas em parte pela mitocôndria e pela liberação do citocromo c. Muitos reguladores que desempenham papel essencial na apoptose foram identificados e mostraram que podem promover ou inibir a perda da integridade mitocondrial (Gree e Reed, 1998; Adrain e Martin, 2001). Já a necrose foi descrita como uma forma descontrolada de morte celular, que muitas vezes resulta em um estresse celular, onde a célula é incapaz de ativar as vias apoptóticas (Kroemer *et al.*, 2009). Durante a necrose, observa-se um inchaço no lugar de uma diminuição da morfologia celular, sendo que este inchaço é devido à perda celular da capacidade osmótica regulatória, resultando na inundação da célula com água e íons (Lennon *et al.*, 1991). A morte celular em mamíferos foi subdividida em três categorias: apoptose (Tipo I), morte celular autofágica (Tipo II) e necrose (Tipo III) (Lockshin e Zakeri, 2001; Bras *et al.*, 2005; van Doorn, 2011). O termo autofagia descreve o processo de degradação do material citoplasmático por meio de lisossomos, e é caracterizado pela formação de vacúolos autofágicos e também pela dilatação do retículo endoplasmático e mitocôndria e um ligeiro aumento do complexo de Golgi (Bras *et al.*, 2005).

Em plantas, a PCD ocorre como parte do seu desenvolvimento (senescência) ou em resposta ao estresse ambiental (Greenberg, 1997). Tal como acontece com os mamíferos, ela está envolvida em resposta a um patógeno (resposta de hipersensibilidade) e estresse (Pennel

e Lamb, 1997; van Doorn e Woltering 2005). van Doorn (2011) propôs a distinção da morte celular programada em plantas, em duas classes: autolítica e não-autolítica. A característica da classe autolítica é o rápido desaparecimento do citoplasma após a ruptura do tonoplasto, sendo que ainda não está claro como essa ruptura acontece. O desaparecimento do citoplasma ocorre devido à liberação de hidrolases presentes no vacúolo, as quais o degradam (van Doorn *et al.*, 2011). Na maioria dos casos deste tipo de PCD, a morte é precedida pelo aparecimento de pequenos vacúolos no citoplasma e também pela fusão dos mesmos, originando vacúolos de tamanho grande, fazendo com que o citoplasma seja substituído pelo volume do vacúolo. Um número considerável de organelas citoplasmáticas, em particular, plastídeos, ribossomos, membranas do retículo endoplasmático e peroxissomos desaparecem durante esse processo (van Doorn *et al.*, 2011). Essas mudanças são muito semelhantes à autofagia que ocorre em células de animais e em células de levedura, embora ainda não seja totalmente claro como o processo é regulado nas plantas e que organelas estão envolvidas. A PCD pertencente à classe autolítica ocorre durante a germinação das sementes, formação das estruturas embrionárias e do desenvolvimento das raízes, durante o estresse abiótico, a falta de oxigênio em raízes e a seca, que conduz ao amarelecimento avançado e processo de senescência (van Doorn, 2003; Gregersen *et al.*, 2008). A classe não-autolítica é caracterizada pela não-ocorrência do rápido desaparecimento do citoplasma, entretanto, esse fator não está relacionado ao aumento da permeabilidade ou mesmo a ruptura do tonoplasto. Não se observa o aumento do volume vacuolar e nem a liberação massiva de uma grande quantidade de hidrolases que são responsáveis pela “limpeza” do citoplasma remanescente (van Doorn, 2011). A classe não-autolítica está relacionada com a reação de hipersensibilidade (RH), com a presença de patógenos necrotróficos em plantas e com ocorrência no endosperma de sementes de cereais (Filonova *et al.*, 2008; van Kan, 2006). A PCD relacionada à RH pode ser dividida em dois grupos: um primeiro grupo que apresenta a liberação de proteínas fisiologicamente ativas do vacúolo e outro grupo onde essa liberação não é observada (van Doorn *et al.*, 2011).

As plantas respondem ao ataque inicial de patógenos por ativação de mecanismos de defesa, reduzindo desta maneira os danos causados por patógenos. A proteção da planta está associada à defesa pré-formada ou à ativação dos seus mecanismos (Hammond-Kosack e Jones, 1996). Segundo Heath (2000), a defesa pré-formada é o principal mecanismo no caso de resistência não específica, que ocorre quando as plantas sintetizam peptídeos, proteínas e metabólitos secundários. A ativação dos mecanismos de defesa promove reações na planta ligadas à ativação de genes que resultam em resistência sistêmica adquirida, produção de

lignina, enzimas hidrolíticas e fitoalexinas (Dangl *et al.*, 2000) e um bloqueio do espalhamento do patógeno pela planta o qual ocorre por meio da rápida morte celular do tecido da hospedeira no ponto que circunda a entrada do patógeno. Esse processo é chamado RH e é uma típica reação de resistência baseada na teoria gene-a-gene (Morel e Dangl, 1997). Flor (1971) propôs por meio de sua teoria gene-a-gene que a resistência a um patógeno depende da presença do gene de resistência (*R*) na planta hospedeira, interagindo com o elicitor ou gene de avirulência (*avr*) presente no patógeno. O resultado de uma tentativa de infecção é dependente tanto do genótipo do hospedeiro quanto do patógeno. O gene *R* presente em plantas confere resistência a diferentes patógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus (Morel e Dangl, 1997).

Existem diferentes respostas mediadas por esses genes de resistência. Cada gene *R* confere resistência a um patógeno específico. A maioria das respostas de defesa mediadas pelo gene *R* são do tipo RH, que se manifesta em discretas lesões necróticas. O vírus normalmente fica restrito à lesão e às células que circundam a lesão, não conseguindo se propagar para outras áreas celulares adjacentes. Um segundo tipo de resistência, conferida pelo gene *R*, consiste da resistência sistêmica adquirida (RSA), que ocorre tanto no sítio primário de infecção como em tecidos não infectados da planta. Após a formação da lesão local necrótica, típica da RH, a RSA pode ser ativada, resultando no desenvolvimento de resistência de amplo espectro e por toda a planta. A RSA é mais duradoura e é caracterizada pelo aumento da expressão de vários genes, relacionados à reação contra o patógeno, os quais codificam componentes antimicrobianos (Soosaar *et al.*, 2005).

Os genes de resistência podem ser classificados com base nos tipos de domínios encontrados nas proteínas por eles codificadas. Um grande número de genes *R* foi identificado na planta *Arabidopsis thaliana* e em outras espécies (Quadro 1.3). A maioria das proteínas de resistência é caracterizada pela presença de dois domínios: LRR e NB-ARC.

O domínio *Leucine Rich Repeat* (LRR) atua como responsável primário pelo elicitor de reconhecimento, ou em um modelo alternativo, e age como protetor da maquinaria celular contra o ataque de patógenos (Dangl e Jones, 2001). O domínio NB-ARC (*Nucleotide Binding, human*; *APAF-1, Plant Resistance Genes and Caenorhabditis elegans CED-4*, (van der Biezen e Jones, 1998) atua nas vias da transdução de sinal, agindo em resposta ao ataque de patógenos, e está envolvido na morte celular programada. A única função associada a esse domínio em plantas é a de resistência a doenças. O domínio NB-ARC é denominado *Nucleotide Binding Site* (NBS) quando se refere a plantas e atua na detecção de proteínas de

virulência do patógeno, desencadeando uma cascata de sinalização e culminando com a resposta de resistência (van der Biezen e Jones, 1998).

Os membros da classe NB-ARC/LRR são subdivididos nos grupos I e II, com base na estrutura dos seus domínios conservados N terminal (Pan *et al.*, 2000). Os genes de resistência, pertencentes ao grupo I, possuem uma região TIR terminal (Toll e receptores de Interleucina), a qual é homóloga ao domínio receptor Toll/Interleucina (Whitham *et al.*, 1994) e são responsáveis por induzir a sinalização de defesa. O segundo grupo de NB-ARC contém os genes *R*, que codificam outro motivo, chamado domínio *coiled coil* (CC) (Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000), o qual pertence o gene *Sw-5* (Spassova *et al.*, 2001). O gene *Sw-5* induz uma RH e também resistência extrema (RE), quando não é possível detectar acúmulo viral e nenhuma outra resposta é visível no sítio de infecção. Os genes de resistência de plantas são capazes de reconhecer vários vírus dentro de uma mesma família, a qual pode apresentar diferentes graus de similaridade na estrutura primária de suas proteínas Avr. Um exemplo é o gene *N*, originário de *N. glutinosa*, ele reconhece todos os tobamovírus, com exceção do *Obuda pepper virus* (ObPV) (Padgett e Beachy, 1993; Moffet, 2009).

Em alguns casos, sintomas de necrose induzidos por infecção viral surgem devido a uma resposta ineficiente mediada por proteínas NB-LRR. Os diferentes resultados associados com as respostas de defesa antiviral são condicionados por um número de fatores, incluindo a eficiência do reconhecimento, sinalização e movimento viral (Moffet, 2009).

Compreender como os patógenos superam o reconhecimento é uma questão importante para a implantação da resistência de amplo espectro e da resistência durável. Claramente, isto é muitas vezes atingido por meio de mutações que resultam em uma perda ou comprometimento funcional do determinante Avr. No entanto, vários genes antivirais *R* fornecem exemplos onde variantes funcionais Avr não são reconhecidos por uma proteína NB-LRR, mas possuem a capacidade de serem reconhecidos por outra proteína (Moffet, 2009).

Quadro 1.3: Proteínas NB-LRR que conferem resistência a vírus em plantas (Adaptado de Moffet, 2009).

Proteína	NB-LRR	Planta	Vírus	Avr	Referências
HRT	CC	<i>Arabidopsis</i>	<i>Turnip crinkle virus</i>	CP	Cooley <i>et al.</i> (2000)
RCY1	CC	<i>Arabidopsis</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	CP	Takahashi <i>et al.</i> (2001)
Rx	CC	Batata	<i>Potato virus X</i> e outros potexvírus	CP	Baures <i>et al.</i> (2008), Bendahmane <i>et al.</i> (2000)
Rx2	CC	Batata	<i>Potato virus X</i>	CP	Bendahmane <i>et al.</i> (2000)
Sw-5	CC	Tomate	Tospovírus	ND	Brommonschenkel <i>et al.</i> (2000)
Tm-2, Tm-2 ²	CC	Tomate	Tobamovírus	1-30K MP	Lanfermeijer <i>et al.</i> (2003), Lanfermeijer <i>et al.</i> (2005)
L ¹ , L ² , L ³ , L ⁴	CC	Pimentão	Tobamovírus	CP	Tomita <i>et al.</i> (2008)
Rsv1	CC	Soja	<i>Soybean mosaic virus</i>	P3	Hajimorad <i>et al.</i> (2005), Hayes <i>et al.</i> (2004)
Ctv	CC	Laranja	<i>Citrus tristeza virus</i>	ND	Rai (2006), Yang <i>et al.</i> (2003)
I	TIR	Feijão	<i>Bean common mosaic virus</i>	ND	Vallejos <i>et al.</i> (2006)
N	TIR	<i>N. glutinosa</i>	Tobamovírus	Helicase: subunidade P50	Erickson <i>et al.</i> (1999), Whitman <i>et al.</i> (1994)
Y-1	TIR	Batata	<i>Potato virus Y</i>	ND	Vidal <i>et al.</i> (2002)

CP = proteína da capa, MP = proteína de movimento, ND = não determinado, CC = domínio *coiled-coil*, TIR = domínio Toll e receptores de Interleucina.

8. Sistema imune de vigilância em plantas e mamíferos

A primeira linha de defesa das plantas e dos animais é provida pelos receptores de reconhecimento - PRRs (PRRs - *pattern recognition receptors*), os quais reconhecem patógenos - MAMPs, ou modelos moleculares associados ao perigo - DAMPs (MAMPs - *microbe-associated molecular patterns* e DAMPs - *danger-associated molecular patterns*, respectivamente), e desencadeiam uma sinalização imune (Coll *et al.*, 2011). A classe melhor estudada de PRRs é a dos receptores do tipo kinase - RLKs (RLKs - *receptor-like kinases*), os

quais possuem ectodomínios de repetição ricos em leucina - LRRs (LRRs - *leucine-rich repeats*) e um domínio kinase intracelular, envolvido na transdução de sinais via cascatas MAPK, resultando no desencadeamento de uma resposta de imunidade via MAMP, denominado MTI (MTI - *MAMP-triggered immunity*) (Jones e Dangl, 2006). Nas plantas, uma segunda classe intracelular de receptores de resposta inata imune é ativada pela via de reconhecimento dos efetores do patógeno, resultando no desencadeamento da imunidade - ETI (ETI - *effector-triggered immunity*) (Coll *et al.*, 2011). O ETI é mediado pelo domínio NB-LRR (*Nucleotide Binding - Leucine Rich Repeat*), que está ligado às proteínas de resistência. O reconhecimento do efector pode ocorrer por meio de uma ligação direta da proteína NB-LRR ou de forma indireta. A hipótese “guarda” explica o reconhecimento indireto, o qual ocorre via uma proteína intermediária, que ocorre a partir da modificação da proteína do hospedeiro pela proteína efetora do patógeno, sendo monitorada por uma proteína específica NB-LRR (guarda) (Dangle e Jones, 2001; Van der Biezen e Jones, 1998).

O reconhecimento do patógeno via NB-LRRs em plantas, conduz a inibição do crescimento do patógeno, o qual é frequentemente, mas não sempre, acompanhado pela reação de hipersensibilidade (RH).

O cloroplasto desempenha um papel central na resposta de defesa e RH em plantas. Primeiro, porque ele constitui uma fonte muito importante na sinalização de moléculas de defesa como as espécies reativas de oxigênio (ERO), intermediários reativos de óxido de nitrogênio (NOI) e nos hormônios de defesa como o ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (JA). Segundo, porque em muitos casos, a luz é requerida para que ocorra o desenvolvimento da RH. Em terceiro, vários efetores de patógenos apresentam sinais de localização no cloroplasto e em alguns casos eles têm mostrado a capacidade de suprimir a imunidade (Guttman *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2007; Jelenska *et al.*, 2007). As formas mais comuns de ERO que atuam como sinalizadores são o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. Diversos estudos demonstram que o AS e ERO atuam em conjunto para desencadear a ativação da morte celular (Shirasu *et al.*, 1997)

Os eventos moleculares que conduzem a RH durante o desencadeamento da imunidade (ETI) são parcialmente sobrepostos com aqueles associados ao MTI, incluindo acumulação de AS, ERO e NOI, ativação da cascata de MAPK, modificações nos níveis de cálcio intracelular, reprogramação da transcrição e síntese de componentes antimicrobianos (Mur *et al.*, 2008). A comparação do MTI com o ETI mostra que o ETI é uma resposta acelerada e amplificada da RH (Jones e Dangl, 2006).

Em mamíferos, vários tipos de morte celular têm sido identificados em resposta a infecção. Um análogo a RH em plantas é a piroptose que é uma forma pró-inflamatória de morte celular inicialmente descrita como necrose dependente da caspase-1 em macrófagos (Brennan e Cookson, 2000). A piroptose tem sido relatada como uma resposta a infecção por bactérias e viroses (Allen *et al.*, 2009). A ocorrência natural da morte celular programada em mamíferos foi primeiramente relatada no século 19 (Clarke e Clarke, 1996) e anos mais tarde, o termo apoptose foi adotado (Kerr *et al.*, 1972). O processo de morte celular envolve a atuação das Caspases, uma família de proteases de cisteína que clivam seus substratos após um resíduo de ácido aspártico. A primeira caspase descoberta em mamíferos foi a enzima conversora de IL-1 β (ICE), mais tarde conhecida como caspase-1, a qual não participa da apoptose, mas controla a inflamação e morte em células piroptóticas após a ativação da NLR (Vance *et al.*, 2009; Martinon e Tschopp, 2007).

Outra modalidade de morte celular em mamíferos é a necrose programada ou necroptose (Degterev *et al.*, 2005). Esta forma alternativa de morte celular programada, é na maioria dos casos iniciada por meio da estimulação da via extrínseca da apoptose, quando as caspases estão ausentes ou inibidas. A necroptose ocorre em resposta à infecção causada por alguns vírus que bloqueiam a apoptose nas células hospedeiras (Challa e Chan, 2010).

A necroptose, que ocorre independente da caspase e a piroptose, que é dependente da caspase-1, constituem dois tipos pro-inflamatórios de morte celular. Em contraste, a apoptose, mediada por caspases apoptóticas, é na maioria dos casos um processo imunológico silencioso, uma vez que corpos celulares são removidos pelos fagócitos, sendo um benefício para minimizar o dano ocorrido durante a resposta imune. A apoptose pode ser desencadeada após o ataque por patógenos, e evidências indicam que ela é essencial para a eliminação dos mesmos (Labbe e Saleh, 2008, Coll *et al.*, 2011).

Patógenos biotróficos de plantas se alimentam de células vivas, sendo assim, eles precisam evitar sua detecção e morte pela planta hospedeira para que possam invadir as células das mesmas. O envolvimento de mecanismos que suprimem a RH, utilizando efetores específicos que são liberados dentro da célula via diversos sistemas de secreção, é um dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelos patógenos. Alguns efetores de *Pseudomonas syringae* patovar tomate DC3000 são capazes de suprimir a RH em tabaco e arabidopsis (Jamir *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2009). Os mecanismos pelos quais a RH é suprimida permanecem desconhecidos, mas a caracterização sistemática do número de efetores

identificados pode ajudar a compreender como eles interferem na defesa das plantas, incluindo o controle da RH (Coll *et al.*, 2011).

Diferente dos patógenos biotróficos, os patógenos necrotróficos adquirem seus nutrientes a partir de células que estão morrendo ou células mortas. Os patógenos necrotróficos desenvolveram mecanismos para induzir a morte celular dos seus hospedeiros por meio da secreção de fitotoxinas e enzimas degradadoras da parede celular, resultando na formação de lesões necróticas expandidas nos tecidos foliares infectados (Alfano e Collmer, 1996; Walton, 1996). Enquanto os patógenos biotróficos envolvem estratégias para suprimir a RH, alguns necrotróficos utilizam a maquinaria da RH das plantas como estratégia para promover sua virulência (Govrin e Levine, 2000).

9. Reguladores da morte celular em plantas

A cadeia de eventos que conduz a morte celular em plantas, após o reconhecimento do efetor pelo receptor via NB-LRR, ainda não foi completamente elucidada. Dois módulos de sinalização regulam as proteínas NB-LRR: um primeiro conhecido como resistência a doenças de raças não-específicas 1 (NDR1 - *nonrace-specific disease resistance 1*) que regula na maioria dos casos a resposta imune mediada pelas proteínas CC-NB-LRR; e um segundo, conhecido como aumento da susceptibilidade a doenças 1 (EDS1)/ deficiente em fitoalexina 4 (PAD4)/ gene associado a senescência 101 (SAG101), esse complexo é mediado pelas proteínas de sinalização TIR-NB-LRR (Aarts *et al.*, 1998). Os dois módulos conduzem ao acúmulo de SA (Shapiro e Zhang, 2001; Wiermer *et al.*, 2005), o qual tem um importante papel na resposta de defesa. ERO e AS agem sinergisticamente conduzindo a RH (Shirasu *et al.*, 1997). Apesar da ausência de homólogos da caspase em plantas, vários estudos utilizando peptídeos inibidores, específicos da caspase, sugerem a presença de atividade de uma protease do tipo caspase na indução de RH em plantas (Lam e del Pozo, 2000; Hatsugai *et al.*, 2004; Rojo *et al.*, 2004).

A mais de uma década, duas novas famílias de proteínas do tipo caspase, metacaspases e paracaspases, foram identificadas *in silico*. Similar as caspases, elas contêm uma díade catalítica conservada de cisteína/histidina e uma hemoglobinase/caspase (Uren *et al.*, 2000; Aravind e Koonin, 2002). As paracaspases são encontradas em animais e micetozoários, enquanto as metacaspases estão presentes em plantas, fungos, protozoários e cianobactérias (Uren *et al.*, 2000). Essas proteases de cisteína diferem das caspases quanto à especificidade pelo substrato; as caspases clivam seus alvos após um resíduo de aspartato, enquanto as

paracaspases são específicas para a arginina (Coornaert *et al.*, 2008, Rebeaud *et al.*, 2008) e as metacaspases podem clivar após uma arginina ou lisina.

As metacaspases em eucariotos têm sido classificadas em Tipo I, quando apresentam uma extensão no seu domínio N-terminal com um pró-domínio que consiste em *Zn-finger* e prolina, característico de proteínas que se ligam ao DNA ou que promovem interações proteína-proteína, e Tipo II quando apresentam uma região com um *linker* entre possíveis subunidades catalíticas p20 e p10 (Uren *et al.*, 2000). As metacaspases do Tipo II estão presentes em algas e plantas, mas não em protozoários ou fungos. Diversas evidências sugerem uma função para as metacaspases durante a RH em plantas. A expressão das metacaspases em plantas de tomate e *Nicotiana benthamiana* é induzida por infecções causadas por patógenos (Hao *et al.*, 2007), o mesmo pode ser observado em plantas de *Arabidopsis* (Zimmermann *et al.*, 2004). Análises da função das metacaspases, utilizando mutantes silenciados, indicaram o papel das metacaspases na susceptibilidade a patógenos biotróficos e necrotróficos (Hao *et al.*, 2007; van Baarlen *et al.*, 2007).

Em plantas, a RH pode ocorrer simplesmente como uma consequência da sinalização da interação planta-patógeno, e como consequência atinge intermediários que conduzem a morte celular de patógenos e hospedeiros (Coll *et al.*, 2011).

10. Vetores de expressão de genes em planta

Vetores desenvolvidos a partir de vírus de plantas tem sido uma alternativa para a transformação estável e expressão de genes heterólogos em plantas. A possibilidade de manipulação do genoma viral permite o uso de vírus como vetores para a expressão de genes exógenos, aliando a isso o fato de que uma grande quantidade do gene pode ser obtida. Outra vantagem é que a maioria dos vírus de plantas é facilmente transmissível e a expressão de genes exógenos pode ser testada em diferentes plantas hospedeiras do vírus (Scholthof *et al.*, 1996).

A expressão de um gene heterólogo em uma planta pode ser de maneira transiente ou estável. A expressão transiente de um gene exógeno ocorre em poucos dias, após o gene ser introduzido dentro da célula. Em uma expressão estável, o gene é replicado no genoma do hospedeiro e pode ser transmitido para a progênie. Embora a expressão não ocorra de maneira uniforme, pode ser alcançada em tecidos que na forma transiente seriam de difícil acesso (Sharma *et al.*, 2005; Brandizzi *et al.*, 2002).

Vários vetores virais têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, ampliando a gama de hospedeiros e de aplicações. O primeiro vetor de expressão viral foi produzido a partir de um vírus de DNA fita dupla, o *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), com a finalidade de expressar o gene dihidrofolato redutase (*DHFR*) (Brisso *et al.*, 1984) e o gene da metalotioneína II (Lefebvre *et al.*, 1987). Atualmente, os vírus mais comumente usados para a expressão de genes heterólogos têm sido o *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Dawson *et al.*, 1989; Donson *et al.*, 1991; Man e Epel, 2006), o *Potato virus X* (PVX) (Chapman *et al.*, 1992) e o *Tobacco rattle virus* (TRV) (Ratcliff *et al.*, 2001).

O vetor viral de plantas PVX (Figura 1.4), desenvolvido por Chapman *et al.* (1992), possui o seu genoma formado por uma fita simples de RNA senso positivo e cinco fases de leitura aberta (ORFs). A primeira ORF, presente na extremidade 5', codifica uma proteína envolvida na replicação viral (Huisman *et al.*, 1988), em seguida aparecem três ORFs que se sobrepõem parcialmente, conhecidas como *triple-gene block*, cuja função está relacionada com o movimento do vírus célula-a-célula e com o transporte vascular. A última ORF codifica a capa protéica. As versões pGR106 e pGR107 (Figura 1.4) contêm o promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), o qual foi clonado em um vetor binário, permitindo a sua agroinoculação. Por ser um vetor viral, o PVX apresenta algumas vantagens como: genoma facilmente manipulável na forma de DNA, ampla gama de hospedeiros, translocação celular por meio de sua proteína de movimento, rápida disseminação na planta infectada e alta taxa de replicação na célula (Chapman *et al.*, 1992). Os sintomas causados em algumas plantas hospedeiras pelo vetor PVX podem ser considerados como limitação do seu uso, já que podem ser confundidos com os sintomas causados pelo gene heterólogo que está sendo expresso na planta hospedeira.

Sistemas utilizando expressão transiente são rápidos e podem ser avaliados com eficiência, a partir do segundo dia até o quarto dia, após a inoculação do vetor na planta hospedeira, após esse período fica difícil detectar a expressão da proteína. Os vetores pGreen II (Helens *et al.*, 2005) e pEAQ (Sainsbury *et al.*, 2009) são exemplos de vetores de expressão transiente utilizados.

O vetor pGreenII 62-SK (Figura 1.5), assim como o vetor PVX, possui o promotor 35S do CaMV e o gene de resistência a canamicina (*NptII*) e foi gerado a partir do vetor pGreenII 0000. O objetivo do desenvolvimento do vetor pGreenII foi demonstrar a flexibilidade do uso do mesmo para investigar atividades enzimáticas, regulação

transcricional e pós-transcricional e processos regulatórios que ocorrem durante a expressão transiente (Helens *et al.*, 2005).

Recentemente, foi desenvolvido um sistema baseado em uma versão inativada do *Cowpea mosaic virus* (CPMV) RNA-2. Este sistema envolve o posicionamento de um gene de interesse, entre a região 3' e 5' UTR do RNA-2 do CPMV, dentro do vetor binário pBINPLUS, fazendo com que o nível de expressão do gene de interesse seja aumentado (Sainsbury e Lomonossoff, 2008). A partir dessa descoberta, uma série de vetores binários, nomeados pEAQ (Figura 1.6), adaptados para expressão transiente foi criada. Para isso, foram removidos mais de 7 Kb de seqüências que não foram consideradas essenciais, pertencentes ao pBINPLUS e a região do T-DNA, e sítios únicos de restrição foram inseridos para permitir a introdução de vários cassetes de expressão. Esses vetores permitem a expressão, em altos níveis e de forma simultânea, de múltiplos polipeptídeos de um único plasmídeo em poucos dias. Além disso, os vetores pEAQ foram desenvolvidos para permitir a clonagem de genes por digestão enzimática do vetor binário e pelo sistema Gateway de recombinação (Sainsbury *et al.*, 2009).

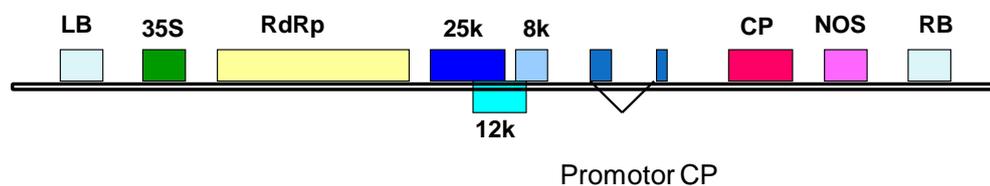


Figura 1.4: Representação esquemática do vetor de clonagem pGR107 (PVX). LB = borda esquerda de *Agrobacterium tumefaciens*; 35S = promotor de transcrição do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); RdRp = RNA polimease RNA dependente do *Potato virus X* (PVX); 25K, 12K e 8K = proteínas de movimento do PVX (triple-gene Box); CP promotor = promotor do gene da capa protéica do PVX; NOS = terminador de transcrição do gene nopalina sintase; RB = Borda direita de *Agrobacterium tumefaciens*.

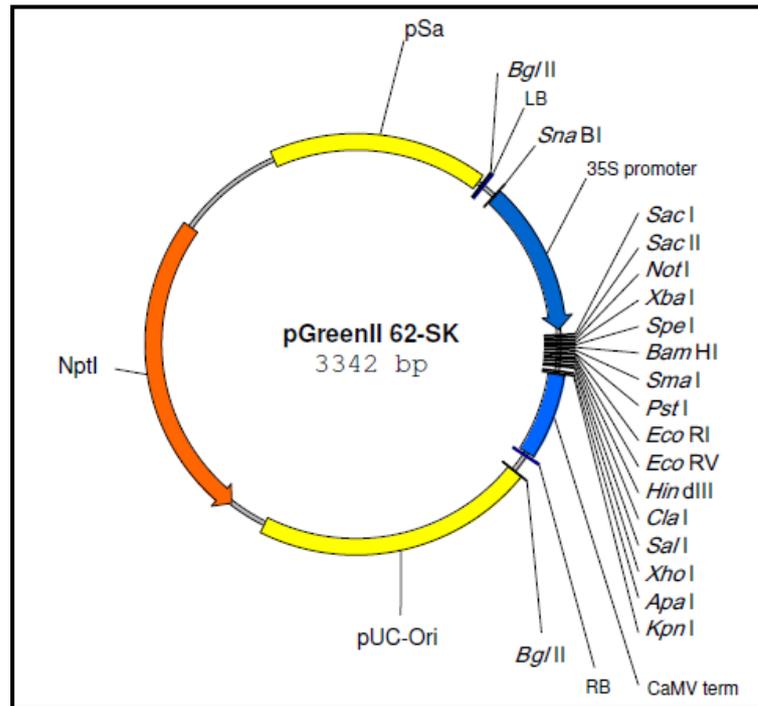


Figura 1.5: Representação esquemática do vetor de clonagem pGreenII 62-SK. pSA = origem de replicação; LB = borda esquerda de *Agrobacterium tumefaciens*; 35S = promotor de transcrição do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); RB = Borda direita de *Agrobacterium tumefaciens*; NptI = fornece resistência à canamicina.

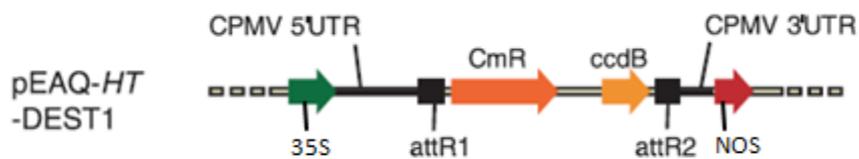


Figura 1.6: Representação esquemática do vetor de clonagem pEAQ-HT Gateway. CPMV 5'UTR = Região 5' não traduzida do *Cowpea mosaic virus* RNA-2; CPMV 3'UTR = Região 3' do *Cowpea mosaic virus* RNA-2; 35S = promotor de transcrição do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); attR1 e attR2 = sítios de recombinação do Gateway; ccdB = gene letal para *E. coli*; CmR = gene de resistência a cloranfenicol; NOS = terminador de transcrição do gene nopalina sintase (Sainsbury *et al.*, 2009).

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar a interação entre o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e plantas de tomate e pimenta, com enfoque nas reações entre genes de avirulência e genes de resistência. Avaliar e comparar a proteína não estrutural NS_S do *Groundnut ring spot virus* (GRSV) e do *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) com outras espécies de tospovírus.

Objetivos específicos:

Capítulo II

- Clonar e sequenciar o gene da proteína NS_S (ainda não caracterizada) envolvido na patogenicidade viral da espécie GRSV.
- Comparar o grau de identidade da sequência de nucleotídeos e aminoácidos e domínios protéicos das proteínas NS_S do GRSV e ZLCV e espécies de tospovírus depositadas em bancos de dados.

Capítulo III

- Construir o vetor de expressão do gene *N* de TSWV e do *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), usando o plasmídeo pGreenII;
- Mapear o domínio da proteína do nucleocapsídeo (N) de TSWV responsável pela indução de reação de hipersensibilidade (RH) em genótipos de pimenta e produzir quimeras com recombinações da porção N terminal e C terminal entre TSWV e TCSV.
- Agroinfiltrar plantas de *Capsicum chinense* com as quimeras de TSWV com *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e monitorar os sintomas de morte celular programada.

Capítulo IV

- Construir o vetor de expressão dos genes *N*, *NS_M*, *NS_S*, *G_C* e *G_N* do isolado de TSWV-BR01, usando o plasmídeo pEAQ-HT Gateway;

- Construir o vetor de expressão do gene NS_M de TSWV- isolado GRAU (originário da Espanha) responsável pela quebra de resistência do gene $Sw-5$ em tomate empregando o plasmídeo pEAQ-*HT* GW;
- Revalidar a plataforma de *Nicotiana benthamiana* transgênica (transformadas com a cópia funcional do gene $Sw-5b$) com a inoculação de genes individuais clonados em pEAQ-*HT* GW do TSWV (isolados BR01- originário do Brasil e gene NS_M do isolado GRAU) como sistema biológico para estudo de genes de avirulência;
- Estudar as possíveis combinações gênicas do TSWV isolado BR-01 em plantas de *N. benthamiana* transgênica na indução de reação de hipersensibilidade mediada pelo gene $Sw-5$.
- Determinar o gene de avirulência do TSWV capaz de induzir reações do tipo RH em plantas que expressam o gene $Sw-5$, utilizando comparativamente os sistemas de expressão pGR107 (pPVX) e pEAQ-*HT* GW.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA E ANÁLISE DO GENE *NS_S* DE DUAS
ESPÉCIES DE TOSPOVÍRUS

Resumo. Os tospovírus *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) causam grandes perdas em cultivos, especialmente em espécies de solanáceas e cucurbitáceas. As duas espécies estudadas tiveram o gene não-estrutural *NS_S* e sua região 5'UTR clonada e sequenciada. O gene *NS_S* do GRSV e do ZLCV apresentou o mesmo tamanho, 1.404 nucleotídeos. A comparação das sequências de aminoácidos da *NS_S* de GRSV com ZLCV mostrou uma identidade de 69,6% e com TSWV uma identidade de 75,9%. A identidade de ZLCV com TSWV foi de 67,9%. Análises filogenéticas, baseadas nas sequências *NS_S*, confirmaram que as espécies estudadas pertencem ao grupo americano. A elucidação das funções da proteína *NS_S* do GRSV e do ZLCV pode contribuir para o entendimento do papel da proteína no comportamento biológico de espécies de tospovírus.

Esse capítulo foi publicado em uma versão modificada como:

Mariana Hallwass; Mikhail O. Leastro; Mirtes, F. Lima; Alice K. Inoue-Nagata; Renato O. Resende. Sequence determination and analysis of the *NS_S* genes of two Tospovirus species. *Archives of Virology*.

1. Introdução

Infecções causadas por tospovírus acarretam prejuízos significativos em cultivos de importância econômica no mundo. O *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) é a espécie tipo do gênero *Tospovirus* e infecta mais de 900 espécies de plantas dentro de 90 famílias botânicas de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Peters, 1998; Parrela *et al.*, 2003). Com base na morfologia, tamanho e aspectos bioquímicos, o gênero *Tospovirus* é classificado dentro da família *Bunyaviridae*, sendo o único gênero na família responsável por infectar plantas (Francki *et al.*, 1991).

No Brasil, as tospoviroses causam elevadas perdas econômicas em cultivos de pimenta, pimentão, alface, tomate, cucurbitáceas e plantas ornamentais. Nas últimas décadas, em adição ao TSWV, cinco espécies de *Tospovirus* foram identificadas: *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV).

O TSWV possui uma ampla gama de hospedeiros, sendo encontrado nos cinco continentes. Assim como o TSWV, o IYSV também é encontrado nos cinco continentes, mas possui uma gama menor de hospedeiros, infectando cebola, alho, e plantas ornamentais, como a alstroemeria, lisianthus e iris (Pozzer *et al.*, 1999; Kritzman *et al.*, 2000; Pappu *et al.*, 2009). O CSNV é encontrado na Ásia, Europa e América do Sul, infectando tomate e crisântemo (Bezerra *et al.*, 1999; Mumford *et al.*, 2003; Matsuura *et al.*, 2007). O GRSV é encontrado na África e América do Sul, infectando amendoim, soja, alface e tomate (de Avila *et al.*, 1993; Pietersen e Morris, 2002); e o TCSV é encontrado na América do Sul, infectando diferentes plantas (de Avila *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1995). Recentemente, um isolado natural, formado por rearranjos de TCSV com GRSV (S e L RNA pertencentes ao GRSV, e M RNA pertencente ao TCSV - L_GM_TS_G, número de acesso NC_015467), foi encontrado em campos de tomate na Flórida (Webster *et al.*, 2011). O ZLCV é restrito ao Brasil, e foi relatado, infectando algumas espécies de cucurbitáceas no Estado de São Paulo, Tocantins e Distrito Federal (de Avila *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1998; Bezerra *et al.*, 1999). O GRSV e o ZLCV diferem biologicamente, principalmente, pela transmissão por espécies distintas de tripes (fator associado às proteínas G_N e G_C) e pela significativa distinção do espectro de plantas hospedeiras (fator associado às proteínas NS_M e NS_S).

O genoma tripartido dos tospovírus consiste de três segmentos de RNA, conhecidos como L (polaridade negativa), M e S (ambisensos). O RNA L codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (de Haan *et al.*, 1991). O RNA M codifica a proteína de

movimento (NS_M) (Kormelink *et al.*, 1994) e o precursor das glicoproteínas G_N e G_C (Kormelink *et al.*, 1992a). O RNA S codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) e a proteína não-estrutural NS_S, um gene com função supressora de silenciamento gênico, demonstrado para o TSWV, plantas e insetos (de Haan *et al.*, 1990; Takeda *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2011). A expressão da proteína NS_S do TSWV aumenta a replicação do baculovírus em diferentes linhagens de células de lepidópteras, sugerindo que a proteína exerça uma função durante a infecção do TSWV no inseto vetor tripes (Oliveira *et al.*, 2011). Devido à importante função relacionada à modulação do sistema de defesa das plantas, também é esperado que a proteína desempenhe um importante papel na interação vírus/planta e que, portanto, diferenças nesta proteína desencadeiem comportamentos biológicos diferenciais entre espécies de tospovírus.

A classificação das espécies de tospovírus segue os critérios do ICTV, como especificidade do vetor, gama de hospedeiros, sorologia da proteína N e porcentagem de identidade de aminoácidos da proteína N (de Avila *et al.*, 1993; Fauquet *et al.*, 2005). A maioria das sequências dos tospovírus disponíveis no banco de dados (DDBJ/EMBL/Genbank) corresponde ao gene N, enquanto que o gene NS_S é, significativamente, menos conhecido, em particular com relação aos tospovírus brasileiros. Neste trabalho, o gene NS_S de GRSV isolado SA-05 e ZLCV isolado BR-09z foram sequenciados e comparados com outras espécies de tospovírus.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolado viral e plantas utilizadas

O isolado de GRSV SA-05 foi mantido e propagado por meio de inoculação mecânica em *Nicotiana rustica* e/ou *Nicotiana benthamiana*. O extrato foliar, usado como fonte de inóculo, foi preparado a partir de folhas de *N. benthamiana* infectadas, armazenadas em freezer a -80 °C, e maceradas em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 1 % de sulfito de sódio e em seguida inoculadas mecanicamente. As plantas utilizadas foram mantidas em casa de vegetação.

2.2 Extração do RNA total

Amostras foliares, apresentando infecção sistêmica, foram coletadas (aproximadamente 14 dias pós-inoculação) e o RNA total foi extraído, utilizando-se o kit Concert Plant RNA Reagent da Invitrogen, conforme as instruções do fabricante.

2.3 Síntese do cDNA viral e amplificação

O oligonucleotídeo GR-1NRe (5' CAGATACTACTTGAAGCAGC 3'), desenhado na região intergênica do segmento S RNA, localizado a 10 nucleotídeos do códon de terminação, foi usado na síntese do cDNA do GRSV. Para a reação de retrotranscrição, 2 µl (aproximadamente 1 µg) do RNA total foi usado com 1,0 µl do oligonucleotídeo GR-1NRe (10 mM) e 2 µl de água Milli-Q autoclavada. A reação foi aquecida a 70°C por 5 minutos e resfriada a 4°C por mais 5 minutos; em seguida, foi adicionada à reação 4 µl de tampão 5X ImProm-II, 2,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 6,1 µl de água Milli-Q autoclavada, 0,5 µl de RNasin Ribonuclease Inhibitor (20 U) e 1,0 µl da enzima Transcriptase reversa ImProm-II (Promega). O anelamento foi feito a 25°C por 5 minutos e a extensão a 42°C, por 60 minutos. A reação foi inativada a 70 °C, durante 15 minutos.

Um segundo oligonucleotídeo, J13 (5' CCCGGATCCAGAGCAAT 3'), o qual se anela na extremidade 5' do RNA viral do GRSV, foi sintetizado para ser usado na reação da polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction* - PCR). O cDNA obtido foi submetido a reação de PCR, em um volume de 100 µl, contendo: 10 µl do cDNA, 10 µl do tampão da *Taq* DNA polimerase 10X (Invitrogen), 8,0 µl de dNTP 10 mM, 3,0 µl de MgCl₂ 50 mM, 2,0 µl do oligonucleotídeo GR-1NRe 10 µM, 2,0 µl do oligonucleotídeo J13 10 µM, 64 µl de água Milli-Q e 1,0 µl da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As reações de PCR foram realizadas no termociclador Mastercycler (Eppendorf), sendo aquecidas a 94°C por 5 minutos, passando a seguir por 30 ciclos, sendo cada um composto de desnaturação das fitas a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e, após o último ciclo, extensões a 72°C por 1 minuto. Concluídos os 30 ciclos, a temperatura permaneceu por 7 minutos a 72°C.

2.4 Clonagem e sequenciamento do fragmento amplificado

O produto amplificado pela PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A banda correspondente ao fragmento de 1,6 Kb foi eluída do gel, usando o Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), conforme as recomendações do fabricante. O produto da

eluição foi ligado ao plasmídeo pGEM-T Easy (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A ligação foi usada para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , por meio de choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). As colônias selecionadas foram incubadas por 12 h a 37°C em meio LB, contendo 100 μ g/mL de ampicilina, seguindo-se da purificação do DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Para confirmar se o fragmento se ligou ao plasmídeo, as amostras foram digeridas com a enzima de restrição EcoR I, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). Após a seleção dos clones, estes foram sequenciados com os oligonucleotídeos T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e SP6 (5'ATTTAG GTGACACTATAG 3') para confirmar se a sequência estava correta.

2.5 Isolado ZLCV

A extração do RNA viral, síntese do cDNA, amplificação e clonagem foram desenvolvidas durante o mestrado do estudante Mikhail Leastro (Leastro, 2010). A partir do sequenciamento dos clones do ZLCV, foi possível fazer as análises de sequências do gene *NS_S* e da 5' UTR.

2.6 Análise das sequências do GRSV e do ZLCV

As sequências de nucleotídeos do gene *NS_S* e da 5' UTR do GRSV e do ZLCV foram compiladas no programa Staden Package (Staden, 1996). As sequências foram alinhadas com as sequências de outros tospovírus disponíveis no banco de dados DDBJ/EMBL/GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) pelo método Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

Os múltiplos alinhamentos de nucleotídeos gerados pelo método Clustal W forneceram os dados necessários para a realização das análises filogenéticas, utilizando o programa MEGA, versão 5.03 (Tamura *et al.*, 2011). As árvores filogenéticas foram construídas, utilizando-se o método Neighbor-Joining Tree, com *bootstrap* de 1000 repetições.

As porcentagens de identidade dos nucleotídeos e aminoácidos das proteínas *NS_S* de GRSV e ZLSV foram determinadas, usando Clustal V (Higgins *et al.*, 1992) por meio do programa MegAlign versão 5.0 (DNAS_tar, Inc., Madison, WI, USA).

As sequências de nucleotídeos do gene *NS_S* de GRSV e ZLCV aqui descritas foram depositadas no banco de dados e receberam os respectivos números de acesso: JN571117 e JN572104.

3. Resultados

3.1 Amplificação e clonagem do cDNA do GRSV

Os oligonucleotídeos GR-1NRe e J13 foram desenhados com a finalidade de amplificar o gene *NSs* do GRSV. A amplificação por PCR resultou na obtenção de um fragmento de, aproximadamente, 1,5 Kb (Figura 2.1). O fragmento obtido foi eluído do gel de agarose, purificado, clonado no plasmídeo pGEM-T Easy e sequenciado.

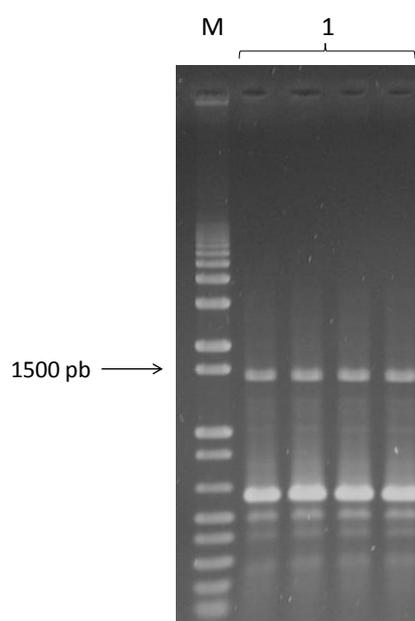


Figura 2.1: Eletroforese em gel de agarose, mostrando a amplificação da região 5'UTR em conjunto com o gene *NSs* do GRSV. M) Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Promega); 1) Amplificação da região 5' UTR e do gene *NSs* de GRSV. A seta indica o tamanho aproximado em pares de bases do fragmento amplificado de DNA.

3.2 Sequenciamento e análise da região 5'UTR e *NSs* do GRSV e do ZLCV

As sequências obtidas, a partir de análises dos clones em pGEM-T Easy, foram analisadas no programa Staden Package e comparadas no programa MegAlign, versão 5.0, usando o Clustal V. O gene *NSs* de GRSV e ZLCV apresentou 1404 nucleotídeos, codificando 467 aminoácidos. A região 5', não traduzida do GRSV e do ZLCV, apresentou 87 nucleotídeos de comprimento (Tabela 2.1). Quando essas sequências foram comparadas, a identidade de nucleotídeos foi de 73.6% (dados não mostrados). A comparação da identidade

de nucleotídeos da região 5' UTR dos tospovírus americanos com os do grupo Euroasiático foi menor que 45% (dados não mostrados).

A sequência de aminoácidos da NS_S do GRSV, descrito neste trabalho, apresentou 97,6% de identidade com a sequência do GRSV (L12048) (Tabela 2.2), a qual foi depositada no banco de dados, em 1993, por um grupo de pesquisadores americanos. Inicialmente, essa sequência foi designada como “tospovírus”, pertencendo ao isolado TSWV B, originário do Brasil. Quando essa sequência foi determinada, os autores suspeitaram que ela não pudesse ser de um isolado de TSWV, devido à baixa identidade de aminoácidos da proteína N com outros isolados de TSWV (Pang *et al.*, 1993). A NS_S do isolado GRSV (NC_015467), recentemente encontrado na Flórida (Webster, 2011), apresentou 99,8% de identidade de aminoácidos com o isolado do GRSV (L12048), relatado em 1993 (Tabela 2.2). Além disso, a sequência de aminoácidos da proteína N do GRSV apresentou 96,1% e 95,3% de identidade com o GRSV (NC_015467) e com o isolado L12048, respectivamente, (dados não mostrados). Um alto nível de identidade da região 5'UTR do GRSV também foi observada com os isolados GRSV (L12048) e GRSV (NC_015467), 98,9% e 100%, respectivamente, (dados não mostrados).

A análise de sequências de aminoácidos da proteína não estrutural NS_S mostrou uma identidade de 69,6%, entre o GRSV e o ZLCV (Tabela 2.2). Os tospovírus *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) e Melon severe mosaic virus (MeSMV), pertencentes ao grupo americano, ainda não foram relatados no Brasil.

Tabela 2.1: Características da NS_S e da região 5' não traduzida de diferentes espécies de tospovírus

Espécies (Acrônimo)	NSs (nt)	5' UTR (nt)	Proteína NSs (aa)
GRSV (JN571117)	1404	87	467
GRSV (L12048)	1404	87	467
GRSV (NC_01546)	1404	87	467
ZLCV	1404	87	467
TSWV	1404	88	467
CSNV	1395	79	464
INSV	1350	78	449
MeSMV	1368	80	455
IYSV	1332	70	443
GBNV	1320	66	439
PolRSV	1332	72	443
WSMoV	1320	66	439
WBNV	1320	66	439
CaCV	1320	66	439
TZSV	1380	64	459
MYSV	1410	68	469
TNRV	1356	65	451
TYRV	1332	71	443
PYSV	1443	57	480
PCFV	1419	67	472
CCSC	1383	66	460

GRSV - *Groundnut ringspot virus*; ZLCV - *Zucchini lethal chlorosis virus*; TSWV - *Tomato spotted wilt virus*; CSNV - *Chrysanthemum stem necrosis virus*; INSV - *Impatiens necrotic spot virus*; MeSMV - *Melon severe mosaic virus*; IYSV - *Iris yellow spot virus*; GBNV - *Groundnut bud necrosis virus*; PolRSV - *Polygonum ringspot virus*; WSMoV - *Watermelon silver mottle virus*; WBNV - *Watermelon bud necrosis virus*; CaCV - *Capsicum chlorosis virus*; TZSV - *Tomato zonate spot virus*; MYSV - *Melon yellow spot virus*; TNRV - *Tomato necrotic ring virus*; TYRV - *Tomato yellow ring virus*; PYSV - *Peanut yellow spot virus*; PCFV - *Peanut chlorotic fan-spot virus*; CCSV - *Calla lily chlorotic spot virus*.

Tabela 2.2: Porcentagem de identidade da proteína não estrutural NS_S entre espécies de tospovírus

Vírus	GRSV	L12048	NC_015467	TSWV	CSNV	ZLCV	INSV	MeSMV
GRSV	100,0							
L12048	97,6	100,0						
NC_015467	97,9	99,8	100,0					
TSWV	75,9	76,5	76,7	100,0				
CSNV	72,8	73,3	73,5	75,4	100,0			
ZLCV	69,6	70,2	70,4	67,9	67,7	100,0		
INSV	51,9	52,1	52,1	48,8	50,6	51,0	100,0	
MeSMV	52,3	53,4	53,4	47,9	49,0	52,3	45,2	100,0

CSNV (AB600873); GRSV (JN571117); GRSV (L12048); GRSV (NC_015467); INSV (NC_003624); MeSMV (EU275149); TSWV (DQ915948); SVNV (HQ728387); ZLCV (JN572104). A porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos da proteína NS_S foi obtida, usando o programa ClustalV no programa MegAlign.

3.3. Análise filogenética dos tospovírus baseada nas proteínas NS_S e N

O resultado obtido com o compilamento das sequências, por meio do programa MEGA 5.1, pode ser verificado nas árvores filogenéticas originadas a partir das sequências de aminoácidos da proteína NS_S e da proteína N, depositadas no banco de dados (Figuras 2.2 e 2.3). Em ambas as árvores, NS_S (Figura 2.2) e N (Figura 2.3), os tospovírus foram divididos em dois clados: o primeiro, formado por espécies de tospovírus americanos e o segundo, que compreende as espécies da Europa e da Ásia.

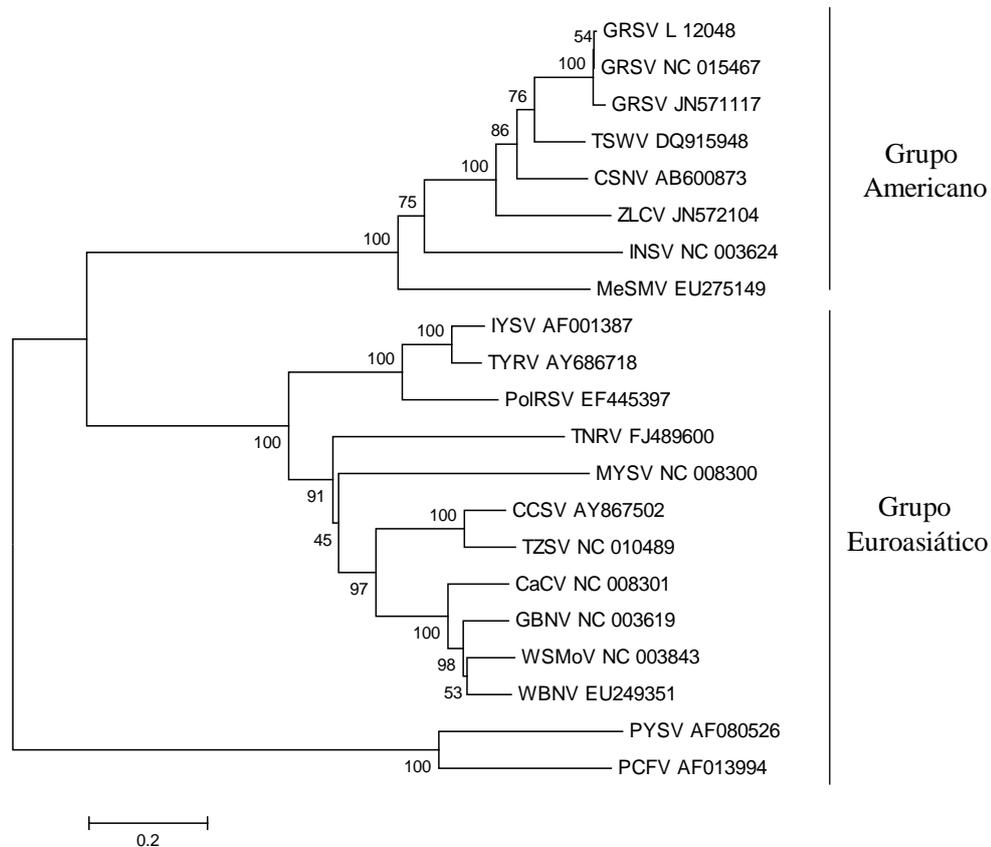


Figura 2.2: Árvore filogenética construída a partir das sequências de aminoácidos da proteína NS_S. A árvore foi construída, usando-se o programa MEGA versão 5.03. Os números que aparecem nas ramificações da árvore (lado esquerdo) indicam a freqüência de cada agrupamento em uma análise “bootstrap” com 1000 repetições. No lado direito, aparecem os números correspondentes aos acessos das seqüências presentes no banco de dados. As sequências NS_S são: CaCV - *Capsicum chlorosis virus*; CCSV - *Calla lily chlorotic spot virus*; CSNV - *Chrysanthemum stem necrosis virus*; GBNV - *Groundnut bud necrosis virus*; GRSV - *Groundnut ringspot virus*; INSV - *Impatiens necrotic spot virus*; IYSV - *Iris yellow spot virus*; MeSMV - *Melon severe mosaic virus*; MYSV - *Melon yellow spot virus*; PCFV - *Peanut chlorotic fan-spot virus*; PYSV - *Peanut yellow spot virus*; PolRSV - *Polygonum ringspot virus*; TNRV - *Tomato necrotic ring virus*; TSWV - *Tomato spotted wilt virus*; TZSV - *Tomato zonate spot virus*; TYRV - *Tomato yellow ring virus*; WBNV - *Watermelon bud necrosis virus*; WSMoV - *Watermelon silver mottle virus*; ZLCV - *Zucchini lethal chlorosis virus*.

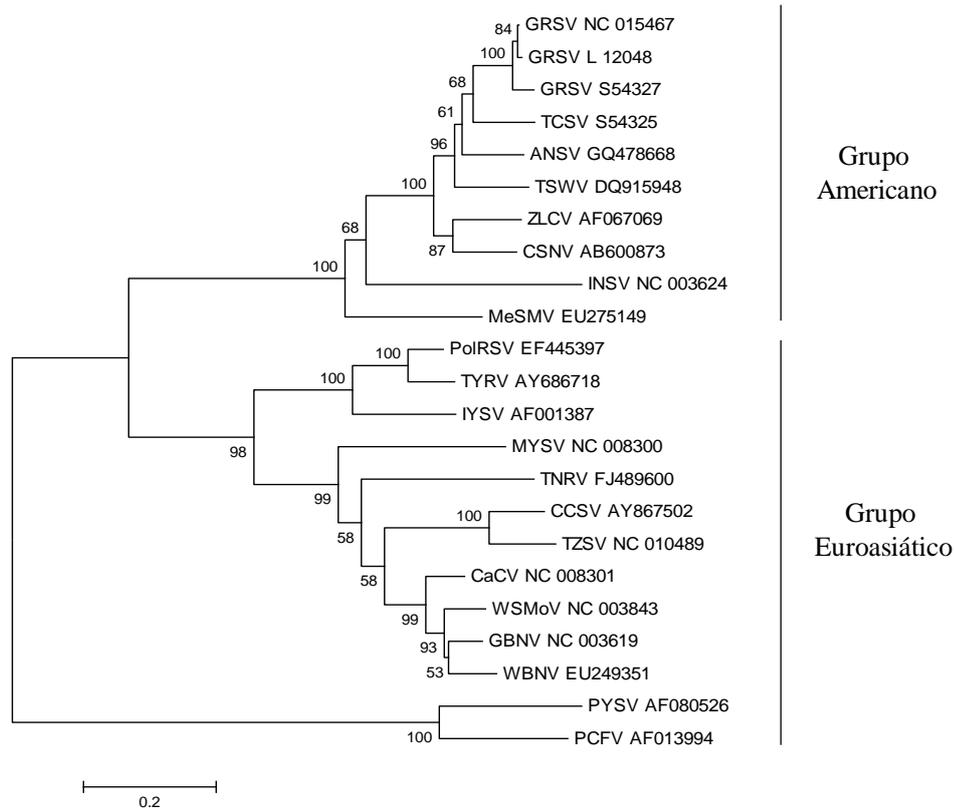


Figura 2.3: Árvore filogenética construída a partir das sequências de aminoácidos da proteína N. A árvore foi construída, usando-se o programa MEGA versão 5.03. Os números que aparecem nas ramificações da árvore (lado esquerdo) indicam a frequência de cada agrupamento em uma análise “bootstrap” com 1000 repetições. No lado direito, aparecem os números correspondentes aos acessos das seqüências presentes no banco de dados. As sequências NS_S são: ANSV - *Alstroemeria necrotic streak virus*; CaCV - *Capsicum chlorosis virus*; CCSV - *Calla lily chlorotic spot virus*; CSNV- *Chrysanthemum stem necrosis virus*; GBNV - *Groundnut bud necrosis virus*; GRSV - *Groundnut ringspot virus*; INSV - *Impatiens necrotic spot virus*; IYSV - *Iris yellow spot virus*; MeSMV - *Melon severe mosaic virus*; MYSV - *Melon yellow spot virus*; PCFV - *Peanut chlorotic fan-spot virus*; PYSV - *Peanut yellow spot virus*; PolRSV - *Polygonum ringspot virus*; TNRV - *Tomato necrotic ring virus*; TSWV - *Tomato spotted wilt virus*; TZSV - *Tomato zonate spot virus*; TYRV - *Tomato yellow ring virus*; WBNV - *Watermelon bud necrosis virus*; WSMoV - *Watermelon silver mottle virus*; ZLCV - *Zucchini lethal chlorosis virus*.

4. Discussão

Este trabalho relata a análise das sequências do gene NS_S e a região 5' não traduzida (5'UTR) do S RNA de dois tospovírus, GRSV e ZLCV.

O comprimento da região 5' UTR revelou características interessantes. O GRSV e o ZLCV apresentaram 87 nt, enquanto que o TSWV apresentou 88 nt. Os dados obtidos permitiram a divisão dos tospovírus analisados em dois grupos bem definidos: o grupo americano, que apresentou uma 5' UTR que variou de 70 a 88 nt, e o grupo euroasiático que apresentou a mesma região com uma variação de 57 a 71 nt (Tabela 2.1). A identidade de nucleotídeos da mesma região do grupo americano, quando comparada com o grupo euroasiático, foi menor que 45% (dados não mostrados).

A classificação taxonômica dos tospovírus pelo ICTV baseia-se no espectro de hospedeiros, sintomatologia, transmissão do vírus pelo inseto vetor, testes sorológicos e análise da proteína N. Considera-se uma nova espécie de tospovírus, aquela que apresenta uma identidade de aminoácidos da proteína N menor que 90% em relação às demais (de Ávila *et al.*, 1993; Fauquet *et al.*, 2005). As demais proteínas dos tospovírus, NS_S , NS_M , polimerase e glicoproteínas não são utilizadas na demarcação de novas espécies. No entanto, é importante investigar a divergência de sequências das mesmas, a fim de auxiliar no estudo de suas funções. A análise da sequência de identidade da proteína N do GRSV com o ZLCV apresentou 81,5% de identidade (dados não mostrados). A árvore filogenética originada, a partir da proteína NS_S , é similar à árvore obtida a partir da proteína N.

Ambas as árvores filogenéticas, originadas a partir das proteínas NS_S e N, dividiram os tospovírus em dois clados: o primeiro, formado por espécies de tospovírus do grupo americano e o segundo, formado por espécies de tospovírus da Europa e da Ásia. Como esperado, as sequências de aminoácidos das proteínas N e NS_S de GRSV e ZLCV agruparam-se com os tospovírus originários do Continente Americano (Figuras 2.2 e 2.3). O GRSV isolado SA-05 agrupou-se com o isolado GRSV (L12048) e, também, com o isolado GRSV (NC_015467) (Webster *et al.*, 2011). A sequência NS_S do ZLCV, também pertencente ao clado americano, ficou mais distante no grupamento formado pelos tospovírus brasileiros (Figura 2.2). De forma similar, Silva *et al.* (2001) obtiveram as mesmas conclusões e propuseram o agrupamento dos tospovírus em dois grupos: Grupo Euroasiático e Grupo Americano, com base na análise filogenética comparativa das proteínas N e NS_M e, também, devido à distribuição geográfica. O alto valor *bootstrap* obtido na comparação da proteína

NS_S (Figura 2.2), originando os clados “Americano” e “Euroasiático”, reflete a evolução das espécies de tospovírus em duas ramificações distintas.

Takeda *et al.* (2002) observaram, por meio de ensaios de expressão transiente, utilizando uma proteína de fluorescência verde (gfp), que a proteína NS_S do TSWV age como um supressor de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Os autores sugeriram que a ação de supressão de silenciamento de RNA pode ocorrer pela enzima Dicer, durante a etapa de geração de dsRNA, ou na etapa Risc, por meio da ligação aos siRNAs. Lokesh *et al.* (2010) observaram que a NS_S pode agir como um supressor do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) por meio da remoção do 5' fosfato do dsRNA, que é o substrato da Dicer (enzima responsável por clivar dsRNA em pequenos RNAs de tamanhos uniformes (siRNA)).

Uma correlação entre a quantidade da expressão da proteína e a virulência dos isolados de tospovírus foi observada, relacionando a proteína com a severidade dos sintomas em tecidos foliares (Kormelink *et al.*, 1991). Também foi demonstrado que a NS_S do *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) age como supressora de silenciamento gênico e tem influência na patogênese viral (Goswami *et al.*, 2011). O papel da NS_S no desenvolvimento de sintomas foi estudado em plantas de tomate transgênico que expressam o gene NS_S do GBNV. Os sintomas observados nas plantas transgênicas imitavam os sintomas induzidos pela infecção do vírus nas mesmas plantas, observando-se senescência e necrose (Goswami *et al.*, 2011). A proteína NS_S da família *Bunyaviridae* possui sequência similar à proteína Reaper, uma proteína pro-apoptótica de drosophila, responsável por controlar a morte celular programada (Thomenius e Kornbluth, 2006).

Devido à função da NS_S do TSWV estar ligada a supressão do silenciamento gênico em plantas, especula-se que esta proteína esteja, diretamente, relacionada à patogenicidade viral e/ou interação vírus/hospedeiro (Kormelink *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.* 2003). Diferente do GRSV, o ZLCV apresenta uma restrita gama de hospedeiros, a qual inclui algumas plantas cucurbitáceas como abobrinha, melão e plantas de *N. benthamiana* em condições experimentais. A diferença nas sequências de aminoácidos pode ser observada entre os isolados de GRSV e ZLCV, que apresentam 69,6% de identidade de aminoácidos (Tabela 2.2). Essas duas espécies diferem biologicamente, principalmente, pela transmissão por espécies distintas de tripes (fator associado às proteínas G_N e G_C) e pela significativa distinção do espectro de plantas hospedeiras. Os fatores determinantes para a especificidade pelo hospedeiro ainda não foram elucidados, mas é possível que a NS_S exerça um papel

importante na interação do vírus com o hospedeiro, interferindo inclusive na gama de hospedeiros.

CAPÍTULO III

ESTUDO DA INTERAÇÃO DA NUCLEOPROTEÍNA (N) DE *TOMATO SPOTTED WILT VIRUS* ELICITORA DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE E MORTE CELULAR PROGRAMADA EM PLANTAS DE *CAPSICUM CHINENSE*

Resumo. Linhagens de pimenta *Capsicum chinense* que possuem o gene dominante *Tsw* exibem uma resposta de resistência do tipo reação de hipersensibilidade (RH) quando inoculadas com o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), enquanto se infectam, sistemicamente, após inoculação com o também tospovírus *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). Estudos realizados com a linhagem ‘PI 159236’ mostraram que a proteína N é o possível fator de avirulência do gene *Tsw*. Quimeras, contendo partes dos genes *N* de TSWV e TCSV, foram construídas e clonadas no vetor binário pGreenII 62-SK com o objetivo de investigar qual região do gene *N* de TSWV é responsável pela resposta do tipo RH em plantas de *C. chinense*. Devido à interação agrobactéria/*Capsicum* provocar sintomas de necrose nas folhas das plantas agroinfiltradas com as construções quiméricas, não foi possível avaliar as regiões genômicas do gene *N* das espécies de tospovírus testadas. O sistema necessita ser otimizado, utilizando novas cepas de *Agrobacterium* mais adequadas a este tipo de avaliação e que não induzam, precocemente, o sintoma de necrose foliar.

1. Introdução

Doenças causadas por tospovírus levam a grandes perdas na produção de diferentes culturas no mundo (Pappu *et al.*, 2009) e a estratégia de controle mais efetiva baseia-se no uso de cultivares resistentes. Diferentes tipos de respostas de defesa são desencadeados por plantas resistentes, que contêm o gene *R*, mediadas pela percepção do gene elicitor do patógeno (também chamado gene de avirulência - *Avr*) (Keen 1990, Soosar *et al.*, 2005). Infecções sucessivas e inibição da dispersão do patógeno ocorrem por meio da morte celular do tecido da planta hospedeira ao redor do ponto de entrada do patógeno, sendo esse mecanismo conhecido como reação de hipersensibilidade (RH), uma típica reação de resistência baseada na teoria gene-a-gene (Flor, 1971; Morel e Dangl, 1997). Os sintomas causados pela RH aparecem na forma de lesões necróticas locais nas folhas inoculadas, seguido por abscisão foliar, não ocorrendo infecção sistêmica. A RH pertence a uma das classes do mecanismo de morte celular programada (*Programmed cell death* – PCD) (van Doorn, 2011) que é um processo desencadeado como resposta à invasão de um patógeno ou sinais de estresse (Chichkova *et al.*, 2004). Em plantas, o processo de PCD também ocorre como parte do desenvolvimento natural da planta (senescência), e em resposta à invasão de patógenos e estresse natural (Greenberg, 1997).

Vírus vegetais, frequentemente, induzem sintomas de necrose em tecidos inoculados e várias dessas reações podem ser caracterizadas como reações de hipersensibilidade, mediadas pelos sistemas de defesa das plantas infectadas (Keen 1990, Soosar *et al.*, 2005). O gênero *Tospovirus*, pertence à família *Bunyaviridae*, compreende pelo menos 23 espécies reconhecidas e tentativas, sendo o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) a espécie tipo e o membro mais estudado do gênero. Uma característica comum entre os vírus que pertencem a essa família é o genoma formado por três segmentos de RNA, sendo eles o segmento L que codifica a polimerase viral; o segmento M que codifica a proteína de movimento NS_M e o precursor das glicoproteínas G_N e G_C, envolvidas na transmissão do TSWV pelo inseto vetor trips; e o segmento S que codifica a proteína não estrutural NS_S com função supressora de silenciamento gênico e a proteína do nucleocapsídeo N.

Em pimentas da espécie *Capsicum chinense*, algumas linhagens como ‘PI 152225’, ‘PI 159236’ (Black *et al.*, 1991; Boiteux e de Avila, 1994) e ‘CNPB 275’ (Boiteux *et al.*, 1993), desenvolvem lesões necróticas locais nas folhas quando inoculadas com TSWV, do tipo RH, seguida por abscisão foliar prematura, não se tornando sistemicamente infectadas. Entretanto, quando inoculadas com isolados de *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut*

ringspot virus (GRSV), espécies bastante disseminadas no Brasil, não há formação de RH, apresentando infecção sistêmica (Boiteux e de Avila, 1994). Estudos de herança, realizados com essas linhagens resistentes, mostraram que todas possuíam um único gene dominante de resistência, denominado *Tsw* (Boiteux, 1995; Black *et al.*, 1996; Jahn *et al.*, 2000). Na Europa, variedades resistentes de *C. annuum*, contendo o gene *Tsw*, são amplamente utilizadas, no entanto, já existem vários relatos de quebra de resistência, causados por isolados de TSWV. Na Itália, Roggero *et al.* (2002) isolaram TSWV de plantas híbridas resistentes, originadas do cruzamento de ‘PI152225’ X *C. annuum*, que apresentaram sintomas típicos de TSWV no ápice foliar e em frutos. Novos isolados, responsáveis pela quebra de resistência, também foram relatados na Espanha (Margaria *et al.*, 2004) e na Austrália (Thomas-Carrol *et al.*, 2003).

Análises de rearranjos gerados após a co-inoculação de dois isolados virais, um capaz de superar a resistência de cultivares contendo o gene *Tsw* e outro, que não foi capaz, revelaram que o RNA S carrega o determinante responsável pela quebra de resistência do gene *Tsw* (Jahn *et al.*, 2000). Comparação de sequências do segmento S de isolados virais responsáveis por superar a resistência e isolados incapazes de infectar plantas de pimentas, contendo o gene *Tsw*, não apresentaram nenhuma diferença entre as proteínas N analisadas, enquanto que análises das sequências das proteínas NS_S mostraram diferenças consistentes (conservadas em uma região específica do gene NS_S) para cada isolado, sugerindo que esta seja o fator de avirulência do gene *Tsw* (Margaria *et al.*, 2007), corroborando com as análises realizadas por Tentchev *et al.* (2011). Lovato *et al.* (2008), utilizaram o vetor *Potato virus X* (PVX) para expressão de três proteínas (N, NS_S e NS_M) do TSWV em plantas de *C. chinense* ‘PI159236’. Os autores obtiveram um resultado diferente, sugerindo que a proteína N seja o fator de avirulência do gene *Tsw* em *C. chinense*.

Partindo dos resultados de Lovato *et al.* (2008), neste trabalho foram estudadas as regiões dos genes N de TSWV e TCSV, visando determinar qual região do gene N de TSWV é capaz de induzir as reações de RH e PCD. A análise da sequências de aminoácidos da proteína N de TSWV e TCSV apresentou uma identidade de 76, 7%. A estratégia utilizada consistiu na construção de quimeras, contendo o gene N de TSWV em combinação com o gene N de TCSV, seguida da agroinfiltração dessas construções em plantas testes. Foram avaliadas a expressão e os efeitos fenotípicos provocados pela infiltração das quimeras em plantas de *C. chinense* ‘PI159236’, usando o vetor de expressão pGreenII 62-SK (Hellens *et al.*, 2005).

2. Materiais e Métodos

2.1 Síntese de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar as sequências dos genes *N* de TSWV isolado BR-01 e TCSV (Tabela 3.1) foram desenhados a partir das sequências depositadas no banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Para amplificação parcial dos genes, os oligonucleotídeos foram sintetizados a partir de uma região comum para os dois genes *N*.

Tabela 3.1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes quiméricos da proteína do nucleocapsídeo (N) de TSWV isolado BR-01 com TCSV.

Oligonucleotídeo	Orientação	Sequência ¹
TSW V1N-Not	Senso	5' AAG GAA AAA ACC <u>CGC GGC CGC</u> ATG TCT AAG GTT AAG CTC 3'
TSW V2N-Xba	Anti-senso	5' CCC <u>TCT AGA</u> TTC AAG CAA GTT CTG CGA 3'
TCSV 2N-Xba	Anti-senso	5' CCC <u>TCT AGA</u> TCA TGC AAC ACC TGA AAT 3'
TS414N-Fo	Senso	5' GTC TGT GAG ACT TGC CAT AAT GC 3'
TS436N-Re	Anti-senso	5' GCA TTA TGG CAA GTC TCA CAG AC 3'

¹Os sítios das enzimas de restrição (NotI - GC GGC CGC, XbaI - TCT AGA) estão sublinhados.

2.2 Isolado viral de TCSV e purificação do RNA viral

Extratos foliares de plantas infectadas com TCSV (de Ávila *et al.*, 1990), armazenados a - 80°C, foram inoculados, mecanicamente, em *Nicotiana benthamiana*. A inoculação foi feita, utilizando-se tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 1 % de sulfato de sódio. As plantas utilizadas foram mantidas em casa de vegetação.

Amostras foliares, apresentando infecção sistêmica, foram coletadas (aproximadamente 14 dias pós-inoculação) e o RNA total foi extraído, utilizando-se o kit Concert Plant RNA Reagent da Invitrogen, conforme as instruções do fabricante.

2.3 Síntese do cDNA (Gene *N* do TCSV) e PCR

A síntese do cDNA do gene *N* do TCSV foi realizada a partir do RNA purificado, usando o oligonucleotídeo TSWV1N-Not (Tabela 3.1) para amplificar o gene *N* completo, e o oligonucleotídeo TS414N-Fo (Tabela 3.1), para obter parte do gene *N*. Para a reação de transcrição reversa, foi usado 1 µg do RNA total purificado e a enzima SuperScript III (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, a reação foi tratada com Ribonuclease H (Invitrogen) e incubada a 37°C, por 20 minutos.

2.4 Reação da Polimerase em Cadeia - PCR

As reações de PCR descritas neste trabalho foram feitas, utilizando-se os seguintes reagentes (Invitrogen) e concentrações para um volume final de 100 µl: 8,0 µl de dNTP (10 mM); 10 µl do tampão 10X; 3,0 µl de MgSO₄ (50 mM); 1 µl de *Taq* Polimerase Platinum High Fidelity (0.25 U); 2,0 µl do oligonucleotídeo anterior (10 µM) e 2,0 µl do oligonucleotídeo posterior, cDNA ou DNA e água Milli-Q para completar o volume final.

Os seguintes programas foram utilizados:

Quadro 3.2: Programas utilizados para amplificar o gene *N*

Programa 1	Programa 2 - OVERLAP
94°C – 5 minutos	95°C – 2 minutos
30 ciclos	30 ciclos
94°C – 1 minuto	94°C – 1 minuto
55°C – 1 minuto	55°C – 1 minuto
68°C – 1 minuto	72°C – 2 minutos
Término dos ciclos	Término dos ciclos
72°C – 7 minutos	72°C – 7 minutos

2.5 Amplificação do gene *N* do TSWV isolado BR-01

O gene *N* presente na construção pGR107+N (Lovato *et al.*, 2008) foi amplificado por PCR (Tabela 3.2- Programa 1), utilizando-se os oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TSWV2N-Xba (Tabela 3.1).

Os oligonucleotídeos TSWV1N-Not com TS436N-Re (Tabela 3.1) foram usados para amplificar parte do gene *N* de TSWV a partir da região 5' até o meio do gene (Figura 3.1A); e os oligonucleotídeos TSWV2N-Xba (Tabela 3.1) com TS414N-Fo foram usados para amplificar a outra metade do gene *N* de TSWV, da região 3' até a metade do gene (Figura 3.1A). Os pares de oligonucleotídeos localizados na região interna do gene *N* (TS414N-Fo e TS436N-Re) foram desenhados a partir da observação das regiões conservadas do gene.

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, eluídos e purificados do gel, utilizando-se o kit Gel Band Purification (GE Healthcare) conforme as recomendações do fabricante.

2.6 Amplificação do gene *N* do TCSV

O cDNA obtido foi submetido a uma reação de PCR (Tabela 3.2- Programa 1), para amplificar o gene *N* completo, em um volume de 100 µl (Item 2.4), contendo os oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TSWV2N-Xba (Tabela 3.1).

Os oligonucleotídeos TSWV1N-Not com TS436N-Re foram usados para amplificar parte do gene *N* de TCSV, a partir da região 5' até o meio do gene (Figura 3.2A); e os oligonucleotídeos TCSV2N-Xba com TS414N-Fo foram usados para amplificar a outra metade do gene *N* de TCSV (Figura 3.2A), da região 3' até a metade do gene. O Programa 1 (Quadro 3.2) foi utilizado para amplificar partes do gene *N* de TCSV. Os pares de oligonucleotídeos localizados na região interna do gene *N* (TS414N-Fo e TS436N-Re) foram desenhados a partir da observação das regiões conservadas do gene.

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, eluídos e purificados do gel utilizando-se o kit Gel Band Purification (GE Healthcare) conforme as recomendações do fabricante.

2.7 Amplificação das quimeras do gene *N* do TSWV com TCSV

Os fragmentos de DNA eluídos do gel foram unidos por meio de uma nova PCR, usando os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TCSV2N-Xba para amplificar a quimera do gene *N* de TSWV (região 5') com TCSV (região 3'), como visualizado na Figura 3.3A; e os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TSWV2N-Xba foram usados para amplificar a outra quimera, formada pelo gene *N* de TCSV (região 5') com TSWV (região 3'), como visualizado na Figura 3.3B. O programa 2 do Quadro 3.2 foi usado nas reações descritas acima.

2.8 Digestão e construção dos vetores recombinantes

Os produtos obtidos pela PCR dos genes *N* de TSWV, TCSV e suas quimeras foram precipitados e digeridos, inicialmente, com a enzima de restrição XbaI (Invitrogen) e, em seguida, com a enzima de restrição NotI (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras digeridas foram separadas em gel de agarose 0,8% e purificadas, usando o Kit Gel Band Purification (GE Healthcare), conforme as recomendações do fabricante. Os produtos da eluição foram ligados ao vetor pGreenII 62-SK, (gentilmente cedido pelo Dr. Roger P. Hellens, Fruit Genomics HortResearch, Nova Zelândia), o qual teve o seu DNA amplificado por círculo rolante (RCA), usando o kit TempliPhi (GE Healthcare). Em seguida, o DNA amplificado foi previamente digerido com as enzimas de restrição XbaI e NotI (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante, e defosforilado, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). A ligação foi então usada para transformar células competentes de *E. coli* (DH5 α).

Os insertos foram sequenciados (Macrogen-Coréia) e, após a confirmação de que as sequências estavam corretas, os plasmídeos recombinantes foram mantidos em *Escherichia coli* e cultivados em meio de cultura LB suplementado com antibiótico canamicina (50 μ g/ml). O DNA plasmidial foi purificado por meio de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e usado na transformação por choque térmico de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. As colônias bacterianas foram crescidas a 28°C durante 48 horas em placas contendo meio LB e ágar contendo 100 μ g/ml de canamicina e 20 μ g/ml de rifampicina. A seleção dos clones recombinantes foi feita por meio de PCR de colônias e utilizou-se oligonucleotídeos específicos para amplificação dos genes *N* de TCSV e TSWV (Tabela 3.1).

2.9 Inoculação dos clones de *A. tumefaciens* em *Capsicum chinense*

As células de *A. tumefaciens* transformadas com as construções pGreenII + N (TSWV, TCSV e quimeras) foram crescidas a 28°C durante 48 horas. Seiscentos microlitros da cultura crescida foram retirados e inoculados em 3 ml de meio de indução (para um litro: 10,5 g de K₂HPO₄; 4,5 g de KH₂PO₄; 1 g de (NH₄)₂SO₄; 0,5 g de C₆H₅Na₃O₇.H₂O; 0,246 g de MgSO₄ (1 mM); 2 g de glicose e 5 ml de glicerol), suplementado com 50 µM de acetosiringona e 10 mM de MES pH 5,6. As culturas foram mantidas a 28°C durante 12 horas. Após 12 horas, as culturas foram centrifugadas por 3300 rpm (rotor F-34-C-38) durante 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5804 R). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 5 ml de meio MS (preparado no momento da utilização): 10 mM de sacarose, 4 g de MS, 150 µM de acetosiringona e 10 mM de MES). Ao final, a densidade ótica (OD) foi medida a 600 nm. Os valores de OD, usados para agroinfiltração, foram de 0.5 e 1.0. Meia hora antes da realização da infiltração, as plantas foram regadas para permitir a abertura dos estômatos e facilitar o processo.

3. Resultados

3.1 Amplificação do gene *N* do TSWV isolado BR01

A reação de amplificação do gene *N* foi feita a partir da combinação dos oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TSWV2N-Xba. Para a amplificação de partes do gene *N* do TSWV foram utilizados os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not com TS436N-Re (porção amino terminal) e TSWV2N-Xba com TS414N-Fo (porção carboxi terminal) resultaram em dois fragmentos, de 436 e 341 pb, respectivamente, (Figura 3.1B).



Figura 3.1: Sequência do gene *N* do TSWV e produtos amplificados do gene *N* do TSWV. (A) Sequência do gene *N* de TSWV. As setas indicam a orientação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene *N* completo com os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TSWV2N-Xba e parte do mesmo, utilizando os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TS436N-Re para amplificar a região 5' e TSWV2N-Xba e TS414N-Fo para amplificar a região 3'. (B) Eletroforese em gel de agarose, mostrando os produtos amplificados do gene *N* de TSWV com os oligonucleotídeos especificados em (A). (M) Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 1) Amplificação parcial do gene *N* correspondente à região 5' com os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TS436N-Re; 2) Amplificação parcial do gene *N* correspondente a região 3' com os pares de oligonucleotídeos TSWV2N-Xba e TS414N-Fo. As setas indicam os tamanhos em pares de bases dos fragmentos amplificados de DNA.

3.2 Amplificação do gene *N* do TCSV

A reação de amplificação do gene *N* foi feita a partir da combinação dos oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TCSV2N-Xba. Para a amplificação de partes do gene *N* do TCSV foram utilizados os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not com TS436N-Re

(porção amino terminal) e TCSV2N-Xba com TS414N-Fo (porção carboxi terminal), que resultaram em dois fragmentos de 436 e 341 pb, respectivamente, (Figura 3.2B).



Figura 3.2: Sequência do gene *N* do TCSV e produtos amplificados do gene *N* do TCSV.

(A) Sequência do gene *N* de TCSV. As setas indicam a orientação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene *N* completo com os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TCSV2N-Xba e parte do mesmo, utilizando os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TS436N-Re para amplificar a região 5' e TCSV2N-Xba e TS414N-Fo para amplificar a região 3'. (B) Eletroforese em gel de agarose, mostrando os produtos amplificados do gene *N* de TCSV com os oligonucleotídeos especificados em (A). (M) Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 1) Amplificação parcial do gene *N* correspondente a região 5' com os pares de oligonucleotídeos TSWV1N-Not e TS436N-Re; 2) Amplificação parcial do gene *N* correspondente a região 3' com os pares de oligonucleotídeos TCSV2N-Xba e TS414N-Fo. As setas indicam os tamanhos em pares de bases dos fragmentos amplificados de DNA.

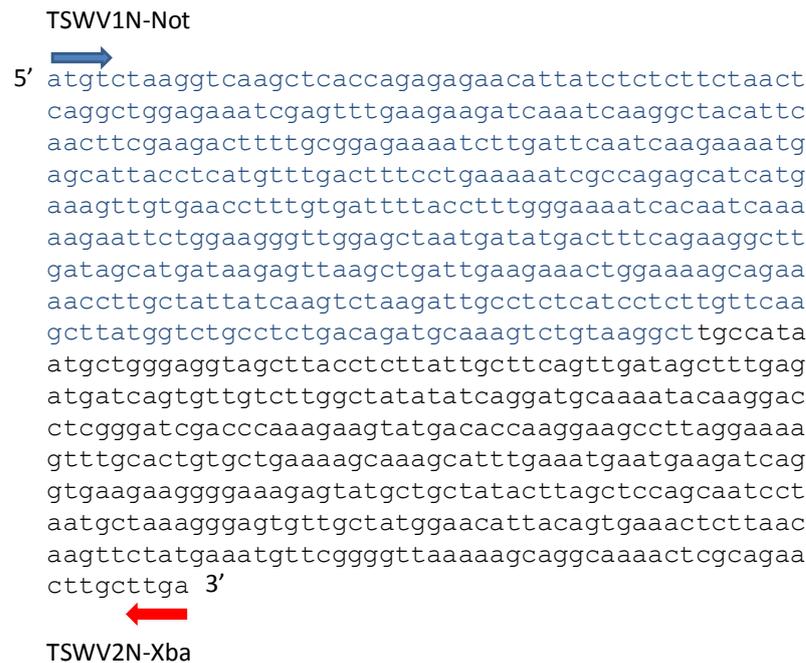
3.3 Amplificação das quimeras do gene *N* do TSWV com TCSV

As sequências amplificadas de partes dos genes *N* de TSWV e TCSV foram submetidas a uma nova reação de PCR. As quimeras foram formadas a partir das combinações do gene *N* de TSWV (região 5') com TCSV (região 3') (Figura 3.3A) e gene *N* de TCSV (região 5') com TSWV (região 3') (Figura 3.3B), originando fragmentos de 777 pb (Figura 3.3C).

(A)



(B)



(C)

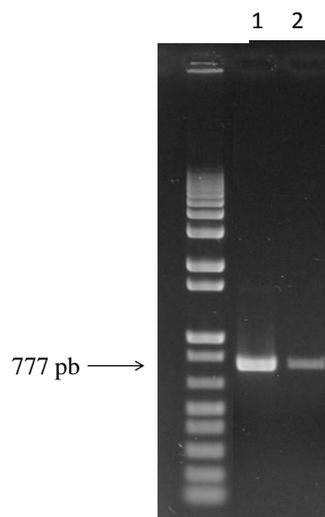


Figura 3.3: Quimeras originadas a partir do gene *N* do TSWV com TCSV. (A) Quimera do gene *N* de TSWV (região 5') em preto, com TCSV (região 3') em azul. (B) Quimera do gene *N* de TCSV (região 5') em azul, com TSWV (região 3') em preto. (C) Eletroforese em gel de agarose, mostrando os produtos amplificados das quimeras dos genes *N* de TSWV e TCSV. M) Marcador molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 1) Quimera do gene *N* de TSWV (região 5') com TCSV (região 3'); 2) Quimera do gene *N* de TCSV (região 5') com TSWV (região 3'). A seta indica o tamanho em pares de bases dos fragmentos amplificados de DNA.

3.4. Construção dos vetores de expressão e agroinfiltração em plantas de *C. chinense*

O gene *N* de TSWV e TCSV e as quimeras formadas pela amplificação de ambos foram clonadas no vetor de expressão pGreenII, originando as construções pGreenII + N de TCSV, pGreenII + N de TSWV e as duas construções quiméricas 5' – 3' de N de TSWV com TCSV (Figura 3.4). As construções foram transformadas em *A. tumefaciens* cepa GV3101 e os clones foram agroinoculados em plantas de *C. chinense* 'PI159236', usando como controle o vetor de expressão pGreenII sem o inserto e apenas agroinfiltração com a agrobactéria GV3101. Nove dias após a agroinfiltração ser realizada, sintomas de “necrose” foram visíveis nas folhas agroinfiltradas, sendo que sintomas similares foram observados nos controles (dados não mostrados). A similaridade dos sintomas induzidos, tanto pelas construções testadas quanto pelo vetor controle, indicaram que sintomas de necrose observados nas folhas inoculadas foram causados pela agrobactéria cepa GV3101 (Figura 3.5). Concentrações alternativas da cepa GV3101 (diferentes intervalos de OD₆₀₀) foram testadas, visando minimizar a indução de necrose pela bactéria, porém sem sucesso. Portanto, com o sistema utilizado (combinação agrobactéria GV3101/ *Capsicum chinense*) não foi possível avaliar a indução de RH por diferentes porções do gene *N* nas construções quiméricas (TSVW / TCSV) utilizadas.

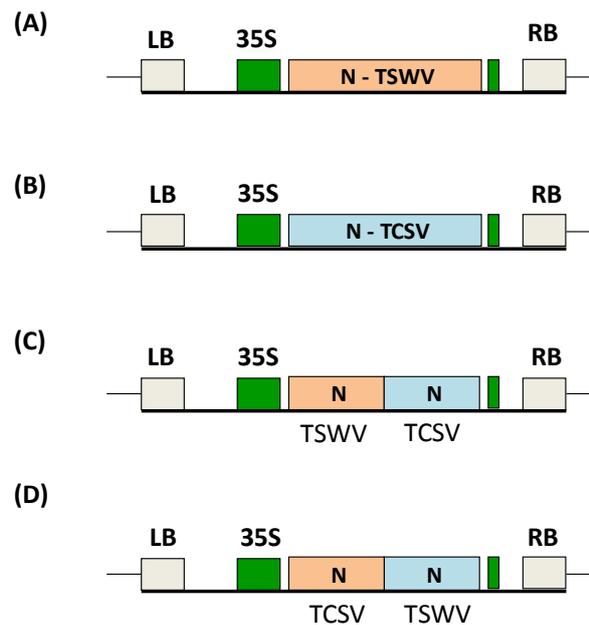


Figura 3.4: Representação esquemática das construções em pGreenII com os genes *N* do *Tomato spotted wilt virus* e *Tomato chlorotic spot virus* e suas quimeras. LB = Borda esquerda de *Agrobacterium tumefaciens*; 35S = promotor de transcrição do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); RB = borda direita de *A. tumefaciens*. (A) Construção em pGreenII contendo o gene *N* do *Tomato spotted wilt virus*. (B) Construção em pGreenII contendo o gene *N* do *Tomato chlorotic spot virus*. (C) Construção em pGreenII contendo a quimera do gene *N* de TSWV (região 5') com TCSV (região 3') (D) Construção em pGreenII contendo a quimera do gene *N* de TCSV (região 5') com TSWV (região 3').

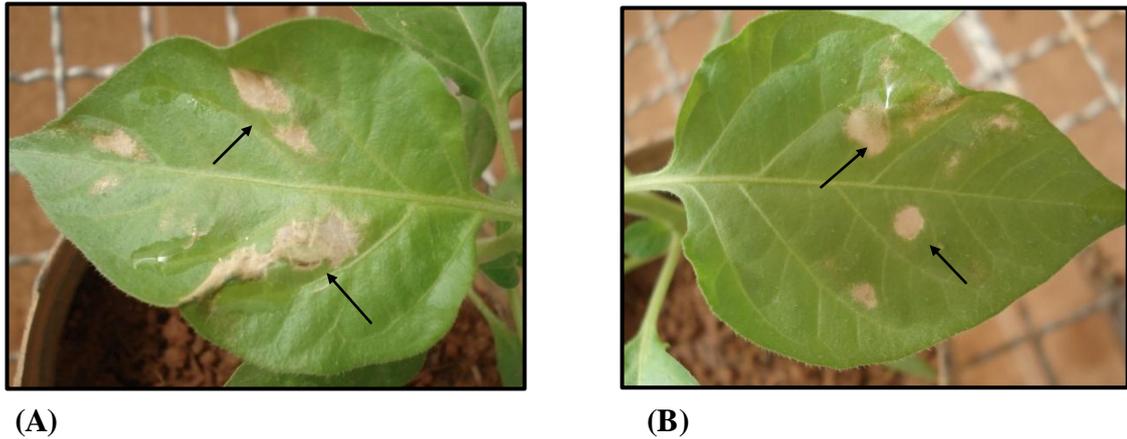


Figura 3.5: Agroinfiltração em folhas de *Capsicum chinense*. (A) Controle negativo - Folha de *C. chinense* 'PI159236' agroinfiltrada apenas com a bactéria GV3101, exibindo sintomas de necrose nas regiões agroinfiltradas (seta preta), 12 dias após a infiltração. (B) Folha de *C. chinense* 'PI159236' agroinfiltrada com a construção pGreenII + N do TSWV BR-01, exibindo sintomas de necrose nas regiões agroinfiltradas (seta preta), 12 dias após a infiltração.

4. Discussão

Black *et al.* (1991) relataram a reação de hipersensibilidade (RH) ao TSWV em *Capsicum chinense*. O gene de resistência responsável por esta interação na planta foi identificado como *Tsw* e vem sendo utilizado em programas de melhoramento genético na Europa e Estados Unidos. Alguns estudos sugerem que uma ou algumas mutações no S RNA do TSWV podem estar associadas à quebra de resistência do gene *Tsw* em plantas de *Capsicum* (Jahn *et al.*, 2000). Experimentos de agroinoculação, em plantas de *C. chinense* genótipo 'PI159236', contendo os genes *N*, *NS_M* e *NS_S* do TSWV clonados no vetor de expressão viral *Potato virus X* (PVX) foram realizados por Lovato *et al.* (2008), com o objetivo de identificar o possível gene de avirulência do *Tsw*. Sintomas típicos de RH como clorose e lesões necróticas locais (marrom-escuras e com bordas delimitadas), seguidos por abscisão foliar foram observadas nas plantas inoculadas com a construção PVX+N. Análises citopatológicas das folhas inoculadas com a construção PVX+N, utilizando o sistema TUNEL (que detecta fluorescência no núcleo quando ocorre a morte celular por meio da marcação da região 3' do DNA fragmentado) identificaram fragmentação do DNA genômico, indicando a ocorrência da morte celular programada no núcleo das células do mesófilo, no local e regiões

adjacentes onde foram observadas as lesões necróticas. As outras construções induziram, apenas, sintomas típicos do PVX e não apresentaram sintomas típicos do tipo RH e sinais citopatológicos de morte celular também não foram observados. Para o gene *N* de TCSV, os sintomas de necrose não foram observados, indicando que ele não é um elicitador da RH e não causa a morte celular nas células infectadas.

A proteína *N* do TSWV foi, claramente, associada à indução de lesões necróticas, típicas de RH nas plantas de *C. chinense*, enquanto que a proteína *NS_S*, em associação com o PVX, aumentou a virulência deste, podendo mascarar qualquer possibilidade de interação do gene de resistência com o de avirulência (Lovato *et al.*, 2008). No entanto, Margaria *et al.* (2007), por meio de análises *in silico*, indicaram que a *NS_S* seria o possível gene de avirulência do *Tsw*, corroborando com as análises realizadas por Tentchev *et al.* (2011), que constataram que a proteína *N* é, significativamente, mais limitada que a proteína *NS_S* em relação ao número de substituições de aminoácidos (para os vírus são mais deletérias as mudanças na proteína do nucleocapsídeo do que na proteína *NS_S*). Com base nos resultados obtidos por Lovato *et al.* (2008), este trabalho teve como proposta o estudo dos domínios protéicos da proteína *N* do TSWV, envolvidos no processo de morte celular e indução de RH em plantas de resistentes *C. chinense*. Para isso, construções quiméricas do gene *N* de TSWV (que induz RH) e TCSV (que não induz necrose tipo RH) foram desenvolvidas e clonadas em um vetor de expressão transiente e agroinfiltradas em plantas de *Capsicum*. O uso de um vetor transiente e não de um vetor viral, visou eliminar a interferência do PVX na expressão de lesões tipo RH em *Capsicum chinense*.

Ensaio de expressão transiente, mediada por *Agrobacterium*, também apresentam algumas limitações, podendo ser algumas vezes restritos a espécies e tecidos que são biologicamente compatíveis e fisicamente acessíveis (Wroblewski *et al.* 2005). Devido à participação de dois organismos no processo, a eficiência dos ensaios de expressão transiente é influenciada por variáveis experimentais que afetam a virulência da *A. tumefaciens*, comprometendo a compatibilidade entre a planta e a bactéria. Algumas cepas de *A. tumefaciens* são mais virulentas que outras para algumas espécies de planta, assim como algumas espécies de plantas também podem ser mais ou menos sensíveis a algumas cepas de *Agrobacterium* (Wroblewski *et al.* 2005). Algumas plantas hospedeiras podem apresentar sintoma de necrose, o qual se assemelha a RH devido à incompatibilidade entre a *Agrobacterium* e a planta (Wroblewski *et al.*, 2005). No presente trabalho, resultados semelhantes foram observados nas plantas de *C. chinense* 'PI159236', agroinfiltradas com o

vetor pGreenII, e com as construções contendo as quimeras e os genes individuais de TSWV e TCSV. O uso da cepa GV3101 nas infiltrações conduziu ao mesmo sintoma de necrose observado por Wroblewski *et al.* (2005); que foi a não ocorrência de compatibilidade entre a cepa de *Agrobacterium* e a planta que está sendo agroinfiltrada. Mesmo com a utilização de diferentes intervalos de OD₆₀₀ no momento da infiltração, os sintomas de necrose surgiram com sete dias após as infiltrações serem realizadas.

Wroblewski *et al.* (2005) testaram diferentes cepas de *Agrobacterium* em plantas de alface, *N. benthamiana* e tomate (representando as plantas da família Solanacea). Os autores puderam observar que das 19 cepas testadas em tomate (cv Rio Grande 57R), 16 causaram necrose nas folhas de tomate agroinfiltradas. As cepas mais indicadas foram a 1D1249, 1D1487 e 15955. A expressão transiente obtida com a cepa 1D1249 não elicitou uma resposta de necrose em tomate, mesmo quando a OD₆₀₀ foi de 2.0. O mesmo teste foi realizado com outras solanáceas, incluindo 21 variedades de tomate comercial, duas espécies de tomate selvagem e três acessos de pimentão. Nenhuma necrose foi observada.

A substituição do meio de infiltração por água deionizada no momento da agroinfiltração também é uma medida recomendada. Wroblewski *et al.* (2005) observaram melhores resultados em algumas plantas, o mesmo poderá ser feito no experimento que será conduzido com as plantas de pimenta, substituindo a solução de infiltração por água.

Zhang *et al.* (2011) observaram que plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana*, expressando uma cópia da proteína de movimento do vírus *Tobacco mosaic virus* (TMV), quando inoculadas com uma construção do vetor viral TMV contendo o gene N modificado (substituição do aminoácido fenilalanina pela alanina) do TSWV apresentavam sintomas de locais de infecção, do tipo RH. A substituição dos aminoácidos foi feita na região C terminal, nas posições 242 e 246. A partir do experimento realizado por Zhang *et al.* (2011) espera-se observar um resultado semelhante nas plantas de *C. chinense* que serão agroinfiltradas com as construções quiméricas.

Em relação às perspectivas de se contornar o problema de incompatibilidade agrobactéria/*C. chinense*, a substituição da cepa de agrobactéria GV3101 pela cepa 1D1249 poderá facilitar a observação dos sintomas de RH causados pelo gene N. As construções obtidas em pGreenII, expressando os genes N de TSWV e TCSV serão transformadas em *A. tumefaciens* cepa 1D1249, para que se possa obter a expressão do gene N em plantas de *C. chinense* 'PI159236', sem ocorrer o aparecimento de lesões necróticas causadas pela *Agrobacterium* cepa GV3101. O próximo passo será a observação dos sintomas de RH por

meio de microscopia de luz, utilizando a marcação com DAB, seguida por descoloração com etanol e coloração com azul de tripano e detecção da proteína N.

CAPÍTULO IV

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE *TOMATO SPOTTED WILT VIRUS*
EM PLANTAS DE *NICOTIANA BENTHAMIANA* TRANSGÊNICA EXPRESSANDO
O GENE DE RESISTÊNCIA *SW-5A* TOSPOVÍRUS**

Resumo. Algumas cultivares de tomate apresentam o gene dominante *Sw-5* e quando inoculadas com os vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e o *Groundnut ring spot virus* (GRSV) exibem uma resposta de resistência do tipo reação de hipersensibilidade (RH). Trabalhos realizados indicaram que o possível gene de avirulência do TSWV está localizado no RNA M dos tospovírus. Para isso, foram utilizadas construções com o vetor de expressão binário pGR107 (pPVX), contendo os genes *N*, *NS_M* e *NS_S* do TSWV, com o objetivo de investigar o gene elicitor da resposta do tipo RH em plantas de *N. benthamiana* transgênica (*Sw-5b*). As construções foram agroinfiltradas nas plantas de *N. benthamiana* e, após cinco dias, foi possível observar os sintomas do tipo RH nas plantas agroinfiltradas com a construção PVX+*NS_M*, indicando que o gene *NS_M*, seja o possível elicitor da resposta de defesa da planta contra a infecção viral.

1. Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma cultura severamente afetada por várias doenças virais. As tospoviroses estão entre essas doenças e são responsáveis por causar severos danos na cultura (Garcia-Cano *et al.*, 2006), sendo um fator limitante na produção de alguns países, como o Brasil, Argentina, Espanha, Portugal e Itália (Aramburu e Marti, 2003; Boiteux e Giordano, 1993; Fineetti-Sialer *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2001).

O *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) é a espécie tipo do gênero *Tospovirus*, e com base na estrutura e organização do seu genoma foi classificado na família *Bunyaviridae*, sendo o único gênero pertencente a essa família com vírus que infectam plantas. O TSWV, o *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), o *Groundnut ring spot virus* (GRSV) e o *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) são as quatro espécies de tospovírus prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e que infectam tomate (Hassani-Mehraban, 2008). Uma característica comum do gênero *Tospovirus* é a presença de três RNAs genômicos denominados S (*small*), M (*medium*) e L (*large*) RNA. O RNA S codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) e a proteína não-estrutural NS_S (de Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1991); o RNA M codifica o precursor das glicoproteína G_N e G_C, ambas presentes na superfície da partícula viral e a proteína de movimento NS_M (Kormelink *et al.*, 1992) e o RNA L codifica a polimerase viral (de Haan *et al.*, 1991; van Poelwijk *et al.*, 1996).

Uma das maneiras mais eficazes de controle do vírus é o uso de cultivares resistentes, estas são geralmente desenvolvidos por meio da introgressão de genes de resistência naturais em genótipos comerciais. Em algumas espécies de tomateiro é possível encontrar fontes de resistência natural ao TSWV, as quais estão sendo usadas em programas de melhoramento genético no Brasil e no mundo. Na última década, vários genes de resistência e seus correspondentes genes de avirulência têm sido estudados. No Brasil, populações derivadas da cultivar Stevens, obtidas do cruzamento de *S. peruvianum*, contendo o gene *Sw-5*, que confere resistência ampla em tomate aos tospovírus TSWV, GRSV e TCSV (Stevens *et al.*, 1992), têm sido estudadas. Plantas que expressam o gene *Sw-5* são capazes de restringir a infecção sistêmica causada por viroses, e as folhas inoculadas apresentam sintomas localizados ou do tipo reação de hipersensibilidade (RH) (Stevens *et al.*, 1992).

Acredita-se que a capacidade do TSWV de se multiplicar no interior do inseto vetor tripses aumenta a possibilidade de diversificação genética da população viral (Ullman *et al.*, 1993; Wijkamp *et al.*, 1993). Adicionalmente, a organização tripartida do genoma dos membros da família *Bunyaviridae* permite a troca de informação de material genético por

meio de rearranjos de segmentos de todo o genoma, originando novos isolados (Elliot, 1995). Recentemente, a análise de rearranjos gerados após co-inoculação de dois isolados de TSWV, um que não infecta cultivares resistentes e outro capaz de infectar cultivares resistentes (contendo o gene *Sw-5*), revelaram que o determinante genético envolvido na superação de resistência destes cultivares está ligado ao RNA M (Hoffman *et al.*, 2001). López *et al.* (2011) verificaram, por meio de análises *in silico*, que a superação da resistência, conferida pelo gene *Sw-5*, pode ser devido à substituição de dois aminoácidos na proteína NS_M do TSWV, observada nos isolados capazes de quebrar a resistência do gene *Sw-5*. Entretanto, essas mutações nos aminoácidos mencionados não foram ainda identificadas para todos os isolados de TSWV, responsáveis por superar a resistência conferida pelo gene *Sw-5* que já foram relatados em cultivos de tomate no Havaí, Austrália, África do Sul (isolado JF1), Espanha (isolado GRAU) e Itália (Thompson e van Zijl, 1996; Aramburu e Marti, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005). O presente trabalho visou determinar o gene de avirulência do TSWV, envolvido na interação com o gene *Sw-5*. O estudo foi realizado, comparando-se isolados que superam e não superam a resistência conferida pelo gene, utilizando uma plataforma biológica constituída por plantas transgênicas de *N. benthamiana*, expressando o gene *Sw-5*. As plantas de *N. benthamiana* foram escolhidas para o trabalho, pois pertence à família Solanacea, assim como o tomate, são fáceis de manipular (realizar infiltrações) e apresentam uma boa expressão de sintomas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Clonagem dos genes *N*, *NS_M* e *NS_S* no vetor de entrada pENTR11

As construções pGR107 + N, pGR107 + NS_M, pGR107 + NS_S, contendo os genes do isolado TSWV BR-01 (Figura 4.1) (Lovato *et al.*, 2008), e pGR107 + NS_M do isolado GRAU, capaz de quebrar a resistência do gene *Sw-5*, foram digeridas com as enzimas de restrição ClaI e Sall, seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen), para isolar os genes do vetor pGR107. Em seguida, as extremidades do fragmento de DNA, correspondendo aos genes, foram preenchidas com uma reação com a enzima T4 DNA polimerase, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen) e o resultado da digestão separado em gel de agarose 1% e purificados usando o kit de extração de DNA Gel Band Purification (GE Healthcare).

O vetor pENTR11* foi digerido com a enzima de restrição EcoRI para a retirada da região *ccdB*, o resultado da digestão foi separado em gel de agarose 1%. Em seguida, o vetor

foi religado, originando um novo vetor pENTR11. O novo vetor, sem a região (*ccdB*), foi digerido com a enzima de restrição *EcoRV* e defosforilado.

Os genes purificados foram ligados ao vetor de entrada pENTR11 (Invitrogen) (Figura 4.2), originando os vetores: pENTR11 + N, pENTR11 + NS_M, pENTR11 + NS_S e pENTR11 + NS_M do TSWV isolado GRAU. Para a verificação da orientação dos insertos, realizou-se a digestão das construções com enzimas de restrição, em seguida, a região de clonagem foi sequenciada.

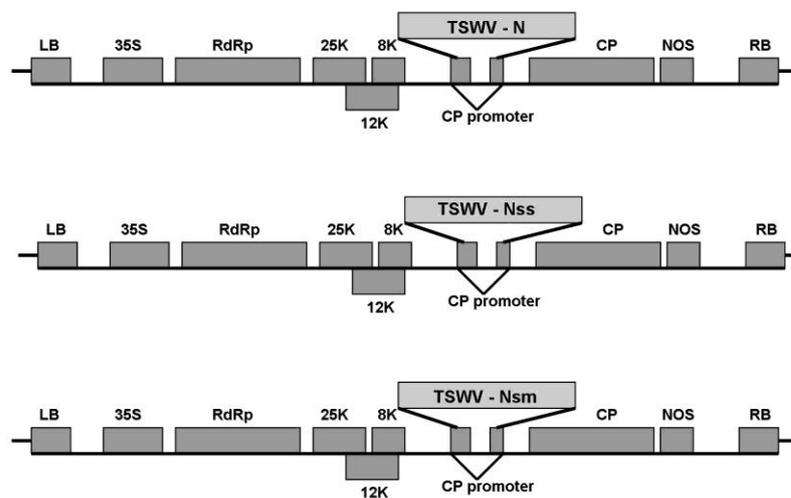


Figura 4.1: Representação esquemática das construções em pgR107 com três genes do *Tomato spotted wilt virus* (N, NS_S e NS_M). LB = Borda esquerda de *Agrobacterium tumefaciens*; 35S = promotor de transcrição do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); RdRp = RNA polimerase dependente de RNA do *Potato virus X* (PVX); 25K, 12K e 8K = proteínas de movimento do PVX; CP promoter = promotor do gene da capa protéica do PVX; CP = proteína da capa do PVX; Nos = terminador de transcrição do gene nopalina sintase; RB = borda direita de *A. tumefaciens* (Lovato *et al.*, 2008).

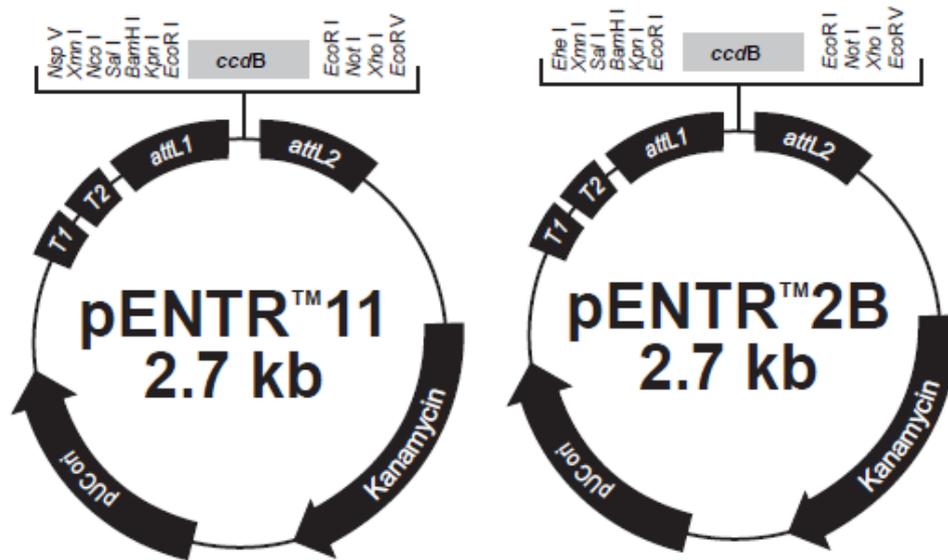


Figura 4.2: Vetores do sistema Gateway pENTR11 e pENTR2B (vetores de entrada). T1 e T2 = seqüências terminadoras da transcrição; attL1 e attL2 = sítios de recombinação específica do vetor de entrada; *ccdB* = gene tóxico para seleção negativa; **Kanamycin** = gene de resistência a canamicina; **pUC ori** = gene de origem da replicação para manutenção do plasmídeo (Invitrogen).

2.2. Clonagem dos genes G_N e G_C no vetor pENTR2B

Os plasmídeos pMON999 + G_N YFP e pMON999 + G_C YFP, produzidos por Ribeiro *et al.* (2008), contendo os genes YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) e os genes do TSWV BR-01 G_N e G_C , respectivamente, foram digeridos com a enzima de restrição BamHI para isolamento dos genes. Estes foram ligados ao vetor de entrada pENTR2B (sem a região *ccdB* – metodologia descrita no item 1.1) (Figura 4.2) (Dianese, 2009), originando os vetores pENTR2B + G_N YFP e pENTR2B + G_C YFP. A clonagem correta foi verificada com a determinação da seqüência dos plasmídeos resultantes no ponto de clonagem.

O vetor pENTR2B foi previamente digerido com a enzima EcoRV e defosforilado. O clone obtido foi enviado para sequenciamento para verificar a orientação correta.

2.3. Clonagem do precursor das Glicoproteínas (GP) no vetor pENTR11

O plasmídeo pBIN + GP (gentilmente fornecido por Dick Lohuis, Universidade de Wageningen) foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI, liberando o gene precursor das glicoproteínas. Em seguida, as extremidades do fragmento de DNA, correspondendo ao gene *GP* (3,4 Kb), foram preenchidas com a enzima T4 DNA polimerase, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen) e o resultado da digestão separado em gel de agarose 1% e purificado, usando o kit de extração de DNA Gel Band Purification (GE Healthcare), posteriormente, o gene foi ligado ao vetor de entrada pENTR11 (Figura 4.2), previamente digerido com a enzima *Eco*RV e defosforilado. O clone obtido foi enviado para sequenciamento para verificar a orientação correta, originando o vetor pENTR11 + GP.

2.4. Recombinação com o vetor pEAQ Gate way

Os clones em pENTR11 e em pENTR2B foram digeridos com a enzima de restrição *Pvu*I para linearizar as amostras e, em seguida, foi feita a recombinação com o vetor de destino pEAQ-*HT*, utilizando o sistema Gateway® Cloning Technology (Figura 4.3), de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). A ligação foi usada para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 α por eletroporação. As colônias selecionadas foram incubadas por 12 h a 37 °C em meio LB, contendo 50 μ g/mL de canamicina, seguindo-se da purificação do DNA (Sambrook *et al.*, 1989), sendo, posteriormente, usados para a transformação em *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404 por eletroporação. A seleção dos clones recombinantes foi feita por meio de PCR de colônias, utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 4.1) para os genes.

Tabela 4.1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *N*, *NS_S*, *NS_M* e *GP* do TSWV isolado BR01 e *NS_M* do TSWV isolado GRAU.

Gene	Oligonucleotídeo	Orientação	Sequência ¹
<i>N</i>	NTSW V1	Senso	5' CCC <u>ATCGAT</u> ATGTCTAAGGTTAAGCTC 3'
	NTSW V2	Anti-senso	5' CCC <u>GTCGAC</u> TTCAA GCAAGTTCTGCGAG 3'
<i>NS_S</i>	NS _S TSW V1	Senso	5' CCCCCATGG <u>ATCGAT</u> GTCTTCAAGTGTT 3'
	NS _S TSW V2	Anti-senso	5' CCC <u>GTCGAC</u> TTATTTTGATCCTGAACG 3'
<i>NS_M</i>	NS _M TSW V1	Senso	5' CCCGTTTAAAC <u>ATCGAT</u> ATGTTGACTCTTTTCG 3'
	NS _M TSW V2	Anti-senso	5' CCC <u>GTCGAC</u> ACTATATTTTCATCAAAG 3'
<i>GP</i>	Zup004	Senso	5'CCC TGT ATG TGT CGT ATC 3'
	Zup20	Anti-senso	5'CCC A GG CTG TCC ATT TTT GG 3'

¹Os sítios das enzimas de restrição (ATCGAT – ClaI, GTCGCA – SalI) estão sublinhados.

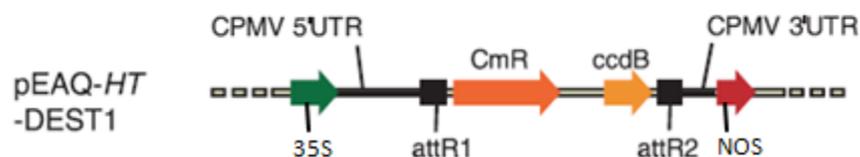


Figura 4.3: Representação esquemática do vetor de clonagem pEAQ-HT Gateway. CPMV 5'UTR = Região 5' não traduzida do *Cowpea mosaic virus* RNA-2; CPMV 3'UTR = Região 3' do *Cowpea mosaic virus* RNA-2; 35S = promotor de transcrição do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); attR1 e attR2 = sítios de recombinação do Gateway; ccdB = gene letal para *E. coli*; CmR = gene de resistência a cloranfenicol; Nos = terminador de transcrição do gene nopalina sintase (Sainsbury *et al.*, 2009).

2.5. Uso de *N. benthamiana* transgênica (transformada com o gene *Sw-5*) para determinação do gene de avirulência

Plantas de *N. benthamiana*, expressando o gene *Sw-5b* de tomate, isolado a partir do cultivar 'Stevens', foram usadas nos experimentos de agroinfiltração, para verificar a ocorrência de reações de hipersensibilidade induzida por TSWV isolado BR-01.

Duas plantas de *N. benthamiana* transgênicas e duas não-transgênicas foram inoculadas, mecanicamente, com TSWV, isolado BR-01 originário do Brasil (de Ávila *et al.*, 1993), sendo essas plantas utilizadas como controle positivo. As inoculações mecânicas foram feitas, utilizando-se extrato de plantas infectadas maceradas em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 1 % de sulfito de sódio. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em observação para verificar o aparecimento de sintomas, até o surgimento de RH ou sintomas sistêmicos (cerca de 8 a 12 dias após inoculação).

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação climatizada.

2.6. Preparo das soluções para agroinfiltração de *A. tumefaciens* em plantas de *N. benthamiana*

As células de *A. tumefaciens* transformadas com as construções nos vetores pGR107 e pEAQ-HT GW foram crescidas a 28°C durante 48 horas. Seiscentos microlitros da suspensão bacteriana foram retirados e inoculados em 3 mL de meio de indução (para um litro: 10,5 g de K₂HPO₄; 4,5 g de KH₂PO₄; 1 g de (NH₄)₂SO₄; 0,5 g de C₆H₅Na₃O₇.H₂O; 0,246 g de MgSO₄ (1 mM); 2 g de glicose e 5 mL de glicerol), suplementado com 50 µM de acetosiringona e 10 mM de MES, pH 5,6. As culturas foram mantidas a 28°C, durante 12 horas. Após 12 horas, as culturas foram centrifugadas a 3300 rpm (rotor F-34-C-38), durante 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5804 R). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 5 ml de meio MS (10 mM de sacarose, 4 g de MS, 150 µM de acetosiringona e 10 mM de MES). Ao final foi feita a leitura da absorbância a 600nm. Os valores do OD₆₀₀ usados para agroinfiltração foram de 0,5 e 1,0. A solução foi usada para agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana* no estágio de 5 a 6 folhas. Meia hora antes de serem realizadas as agroinfiltrações, as plantas foram regadas para permitir a abertura dos estômatos e facilitar a agroinfiltração. A agroinfiltração das plantas foi realizada com uma seringa de 5 mL sem agulha, sobre a face abaxial de todas as folhas. Após as agroinfiltrações, todas as plantas foram mantidas em câmaras de crescimento com temperatura a 28 °C e iluminação controlada.

2.7. Agroinfiltração das construções, contendo individualmente os genes *N*, *NS_S*, *NS_M*, de TSWV isolado BR-01 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Em todos os ensaios, foram usadas duas plantas de *N. benthamiana* para cada construção feita com o vetor pGR107 (vetor pPVX), contendo os genes de TSWV isolado BR-01 (Lovato *et al.*, 2008). Todas as construções foram transformadas por eletroporação em *A. tumefaciens* linhagem GV3101 e crescidas em 3 mL de meio líquido LB3 (para um litro: 10 gramas de triptona; 5 g de extrato de levedura; 4 g de NaCl; 1 g de KCl; 3 g de MgSO₄.7H₂O), contendo os antibióticos canamicina e rifampicina nas seguintes concentrações, respectivamente: 100 µg/mL e 20 µg/mL. As culturas foram crescidas a 28° C, durante 48 horas, conforme item 1.6.

2.8. Agroinfiltração das construções, contendo os genes *N*, *NS_S*, *NS_M*, *GP*, *G_N* e *G_C* do TSWV isolado BR-01 e *NS_M* isolado GRAU mediada por *Agrobacterium tumefaciens* no vetor pEAQ-*HT* GW

Os genes *N*, *NS_S*, *NS_M*, *GP*, *G_N* e *G_C* do TSWV isolado BR-01 e *NS_M* isolado GRAU clonados no vetor pEAQ-*HT* GW foram transformados em *A. tumefaciens* linhagem LBA 4404 em 3 mL de meio líquido LB3 (para um litro: 10 gramas de triptona; 5 g de extrato de levedura; 4 g de NaCl; 1 g de KCl; 3 g de MgSO₄.7H₂O), contendo os antibióticos canamicina e rifampicina nas concentrações 100 µg/mL e 20 µg/mL, respectivamente. As culturas foram crescidas a 28° C, durante 48 horas, conforme o item 1.6.

Duas plantas para cada construção com o vetor pEAQ-*HT* GW, contendo os genes do TSWV (pEAQ GW + *N*, pEAQ GW + *NS_M*, pEAQ GW + *NS_S*, pEAQ GW + *GP*, pEAQ GW + *G_C* YFP, pEAQ GW + *G_N* YFP, pEAQ GW + *NS_M* GRAU). Como controle, quatro plantas foram utilizadas: a) agroinfiltrada com o vetor pEAQ-*HT* GW, b) uma segunda, com a agrobactéria LBA4404, c) agroinfiltrada com solução tampão e d) inoculada mecanicamente com o vírus TSWV BR-01.

As mesmas inoculações foram realizadas em plantas de *N. benthamiana* não transgênicas.

2.9. Co-infiltração das construções no vetor pEAQ-HT GW, contendo os genes *N*, *NS_S*, *NS_M*, *GP*, *G_N* e *G_C* de TSWV isolado BR-01 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O protocolo de preparação das construções para este experimento está descrito no item 1.6. Após medir o OD, as soluções contendo as construções foram misturadas em proporções iguais para que as co-infiltrações fossem realizadas.

Dezesseis plantas de *N. benthamiana* transgênica (*Sw-5b*) foram utilizadas no experimento. O controle positivo foi realizado em duas plantas de *N. benthamiana* transgênica, as quais foram inoculadas mecanicamente com o vírus TSWV BR-01. O controle negativo consistiu de duas plantas de *N. benthamiana* transgênica inoculadas mecanicamente com o vírus TSWV BR-01.

As seguintes combinações gênicas foram utilizadas na agroinfiltração:

- 1) pEAQ-HT + *N* + pEAQ-HT + *NS_M*
- 2) pEAQ-HT + *N* + pEAQ-HT + *NS_S*
- 3) pEAQ-HT + *N* + pEAQ-HT + *GP*
- 4) pEAQ-HT + *NS_M* + pEAQ-HT + *NS_S*
- 5) pEAQ-HT + *NS_M* + pEAQ-HT + *GP*
- 6) pEAQ-HT + *NS_S* + pEAQ-HT + *GP*

2.10. Co-infiltração das construções contendo os genes *N*, *NS_S*, *NS_M*, *GP*, *G_N* e *G_C* de TSWV isolado BR-01 e *NS_M* isolado GRAU mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em combinação com o vetor pCGN + *Sw-5b*

Quatorze plantas de *N. benthamiana* transgênica foram utilizadas nas agroinfiltrações, duas para cada construção, contendo os genes do TSWV BR-01 e *NS_M* do isolado GRAU em conjunto com o vetor pCGN + *Sw-5b*. Como controle, duas plantas de *N. benthamiana*, uma transgênica, contendo o gene *Sw-5b* e outra não, foram inoculadas mecanicamente com o vírus TSWV BR-01.

2.11. ELISA e Western blot

Cinco dias após a agroinfiltração, as plantas inoculadas mecanicamente com o vírus TSWV isolado BR-01 foram testadas por meio de *double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS-ELISA) (Clark & Adams, 1977) utilizando o anticorpo policlonal para a proteína N de TSWV.

Após o mesmo período, amostras foliares das plantas agroinfiltradas com as construções em pGR107 e pEAQ-*HT* foram coletadas. Os extratos da proteína total foram desnaturados e separados em gel SDS-PAGE descontínuo (Laemmli, 1970), em seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore). Após o bloqueio com PBS 1x, contendo leite em pó 2%, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo policlonal (diluição 1:1000 em PBS 1x e 0,25% de leite em pó) contra as proteínas N, NS_M, NS_S, GP, G_N e G_C. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1:500 em PBS-Tween 1x, contendo 0,25% de leite em pó e tampão AP 9.5 (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.05% Tween 20, pH 9.5). A revelação foi feita por colorimetria com a adição de 50 µL de NBT/BCIP em tampão AP 9.5.

2.12. Remoção da clorofila

Durante o acompanhamento da evolução dos sintomas nas plantas agroinfiltradas, as folhas das plantas testadas com as diversas construções e que apresentaram sintomas semelhantes à necrose foram coletadas e armazenadas em placas de *petri*, contendo etanol absoluto, durante 24 horas, para que a clorofila fosse removida e os sintomas pudessem ser visualizados (Hwang e Hwang, 2011).

3. Resultados

3.1 Ensaios de expressão em plantas de *Nicotiana benthamiana* não transgênica, utilizando o vetor de expressão pGR107, contendo os genes N, NS_M, NS_S do TSWV-BR-01 e o gene NS_M do TSWV isolado GRAU

Este primeiro ensaio foi feito apenas para testar as construções no vetor pGR107. As construções pGR107 + N, pGR107 + NS_M e pGR107 + NS_S foram agroinfiltradas nas

plantas de *N. benthamiana* não transgênica. Os primeiros sintomas nas plantas agroinfiltradas surgiram 9 a 11 dias após a inoculação e consistiram de clorose internerval e mosqueado (Figura 4.4). Esses sintomas foram idênticos àqueles causados pelo vírus selvagem PVX. Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com pGR107 + NS_S apresentaram necrose sistêmica severa, 15 dias pós-infecção, seguida pela necrose das folhas e hastes ou morte da planta. A expressão do gene NS_S intensificou os sintomas causados pelo vetor pPVX (Figura 4.4E).

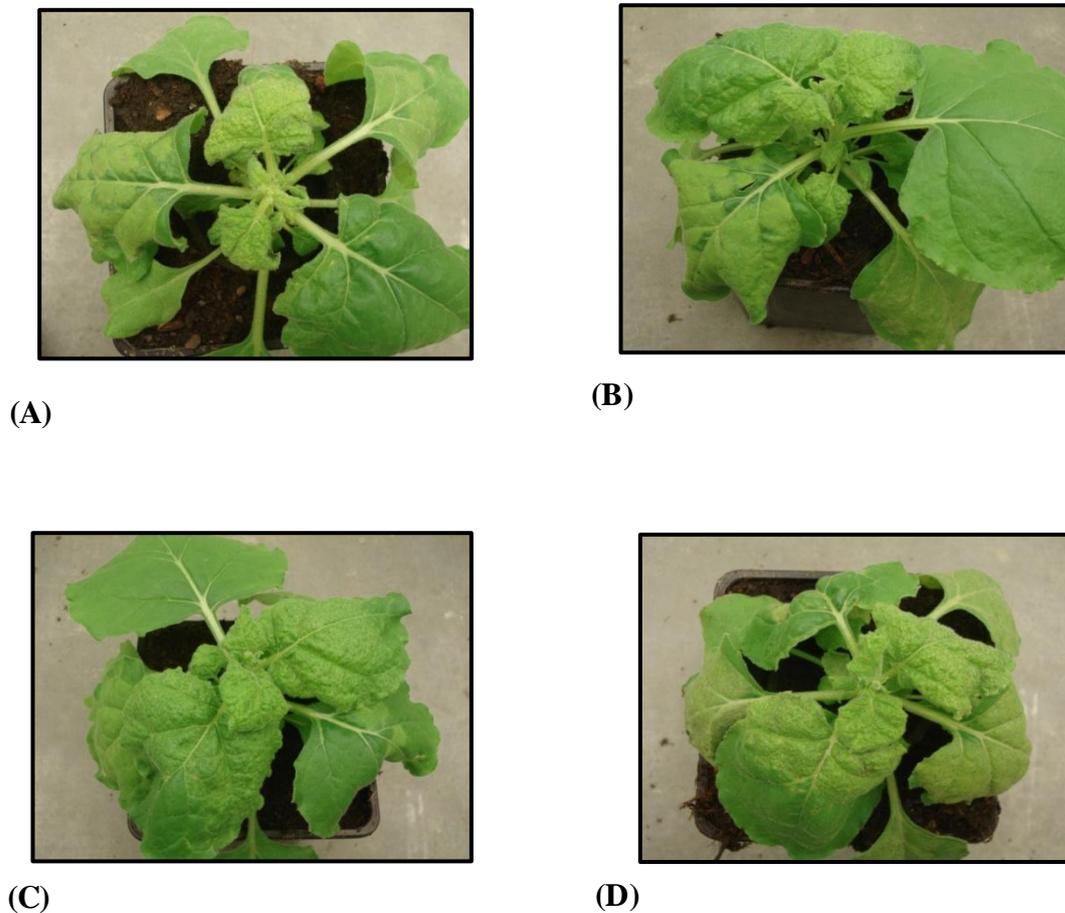


Figura 4.4: Sintomas de clorose internerval e mosqueado em plantas de *Nicotiana benthamiana*. (A) *N. benthamiana* agroinfiltrada com pGR107 (pPVX). (B) *N. benthamiana* agroinfiltrada com pGR107 + N. (C) *N. benthamiana* agroinfiltrada com pGR107 + NS_M. (D) *N. benthamiana* agroinfiltrada com pGR107 + NS_S.

3.2 Ensaios de expressão em plantas de *N. benthamiana* transgênica, utilizando o vetor de expressão pGR107, contendo os genes *N*, *NS_M*, *NS_S* do TSWV-BR-01 e o gene *NS_M* do TSWV isolado GRAU

As construções pGR107 + N, pGR107 + NS_S, pGR107 + NS_M isolado BR-01 e pGR + NS_M isolado GRAU foram agroinfiltradas nas plantas de *N. benthamiana* transgênica (gene *Sw-5b*). Os primeiros sintomas nas plantas agroinfiltradas com as construções pGR107+N e pGR107+NS_S surgiram 9 a 11 dias após a inoculação e consistiram de clorose internerval e mosqueado em folhas não inoculadas, semelhantes aos observados nas folhas de *N. benthamiana* não transgênica e típicos de infecção causada por PVX (Figura 4.5A e 4.5B). Os sintomas nas folhas inoculadas com a construção pGR107+ NS_M isolado BR-01 surgiram com 5 dias após a agroinfiltração, na forma de manchas necróticas marrom escuras e com bordas delimitadas (Figura 4.5C), o mesmo não foi observado nas folhas agroinfiltradas com a construção pGR107+ NS_M isolado GRAU (Figura 4.5D). O tipo de sintoma observado, formado por manchas necróticas marrom escuras, indicou a indução de RH nas folhas inoculadas causadas pela construção pGR107 + NS_M isolado BR-01 do TSWV, em contraste com a não indução de sintomas pelo isolado que supera a resistência do gene *Sw-5*.

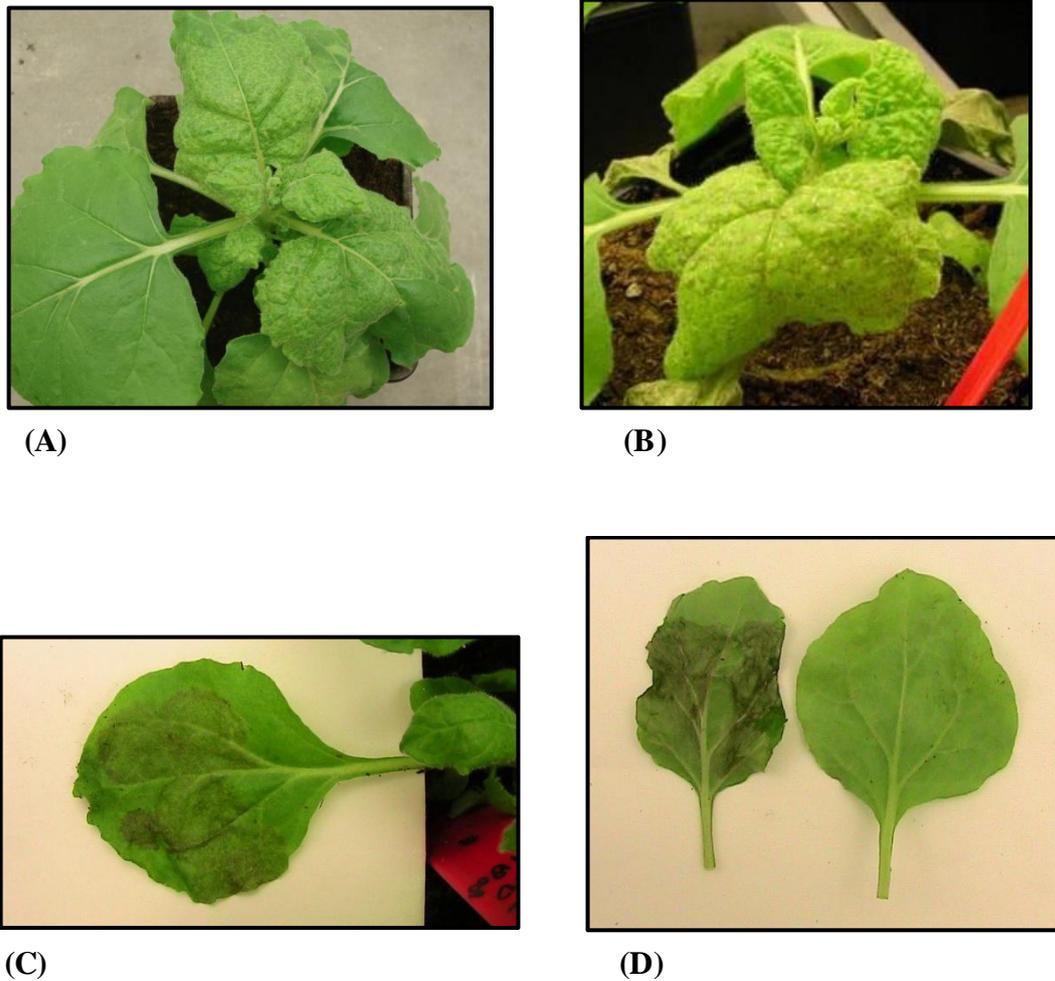


Figura 4.5: Plantas de *Nicotiana benthamiana* (*Sw-5b*) agroinfiltradas com as construções do vetor pGR107. (A) *N. benthamiana* (*Sw-5b*) agroinfiltrada com pGR107 + N (B) *N. benthamiana* (*Sw-5b*) agroinfiltrada com pGR107 + NS_s. (C) Folha de *N. benthamiana* (*Sw-5b*) agroinfiltrada com pGR107 + NS_M. (D) Folha de *N. benthamiana* agroinfiltrada com pGR107 + NS_M isolado BR-01(esquerda) e folha de *N. benthamiana* agroinfiltrada com pGR107 + NS_M isolado GRAU, não apresentando sintoma (direita).

3.3 Visualização dos sintomas e expressão do gene NS_M do TSWV isolado BR-01 e isolado GRAU

A partir da reação similar a RH, induzida pela construção pGR107 + NS_M isolado BR-01, folhas das plantas agroinfiltradas foram coletadas para a remoção da clorofila e realização do Western blot. A remoção da clorofila permitiu evidenciar a diferença entre as amostras agroinfiltradas com a construção pGR107 + NS_M isolado BR-01, que apresentou as

manchas necróticas marrom escuras, e pGR107 + NS_M isolado GRAU, que não apresentou os sintomas visualizados com a construção pGR107+NS_M isolado BR-01 (Figura 4.6A). A análise do Western blot, realizada com o antissoro contra a proteína NS_M do TSWV BR-01, demonstrou que os genes NS_M isolados BR-01 e GRAU clonados no vetor pGR107, foram eficientemente expressos nas plantas de *N. benthamiana* transgênica (Figura 4.6B) e que os sintomas necróticos observados com o isolado BR-01 parecem estar relacionados a expressão da proteína NS_M.

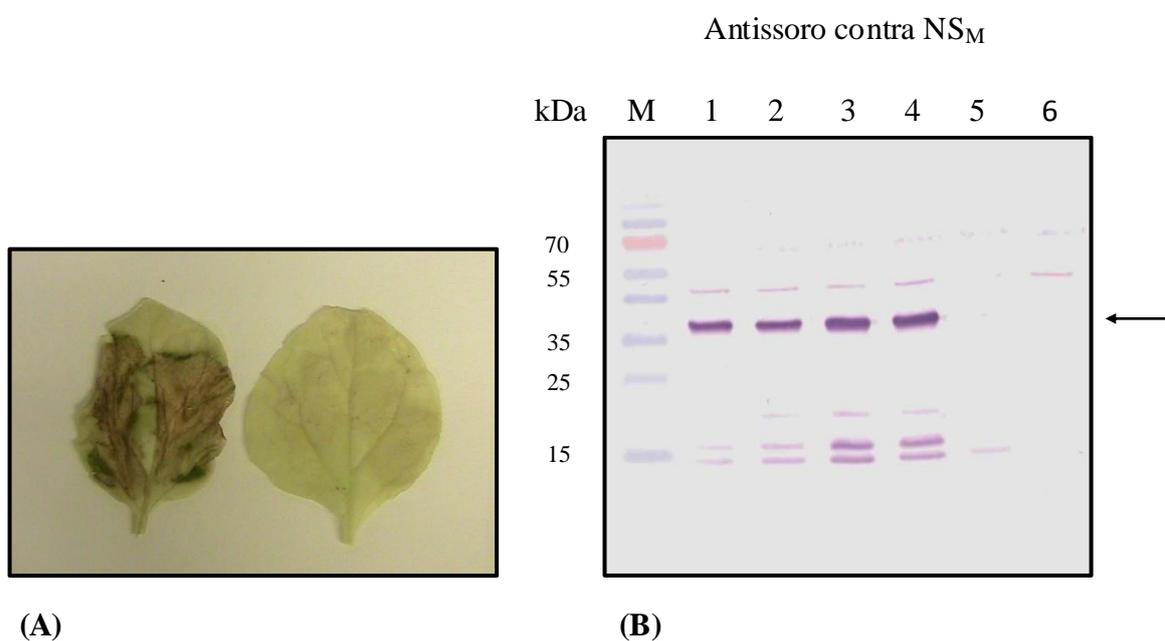


Figura 4.6: Folhas de *Nicotiana benthamiana* (Sw-5b) tratadas com etanol e expressão das proteínas NS_M isolado BR-01 e GRAU do TSWV, utilizando a técnica de Western blot. (A) Folhas de *N. benthamiana* tratadas com etanol. Folha de *N. benthamiana* (esquerda), apresentando sintomas de necrose agroeinfiltrada com a construção pGR107 + NS_M isolado BR-01 e folha de *N. benthamiana* (direita) agroeinfiltrada com a construção pGR107 + NS_M isolado GRAU, não apresentando sintomas de necrose. (B) Análise de Western blot com anticorpo policlonal específico para a proteína NS_M (33,6 KDa) de TSWV. M = marcador de massa molecular de proteínas (KDa); Amostras 1 e 2) pGR107 + NS_M isolado BR-01, 3 e 4) pGR107 + NS_M isolado GRAU, 5 e 6) pGR107.

3.4 Ensaios de expressão em plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênica, utilizando o vetores de expressão pEAQ-*HT* contendo os genes *N*, *NS_M*, *NS_S*, *GP*, *G_N* e *G_C* do TSWV-BR-01 e o gene *NS_M* do TSWV isolado GRAU

O vetor binário pEAQ-*HT* Gateway, que é uma combinação dos vetores pEAQ e CPMV-*HT* (versão com deleções do *Cowpea mosaic virus* RNA-2), foi escolhido para ser utilizado nos experimentos de recombinação, pois apresenta algumas vantagens em relação a outros sistemas de expressão transiente: permite a produção de algumas miligramas de proteínas recombinantes entre 2-3 semanas sem a replicação viral, é um sistema mais econômico e que não requer conhecimentos técnicos aprofundados (Sainsbury *et al.*, 2009).

O vetor recombinante pEAQ-*HT* foi utilizado para substituir o vetor viral pGR107 (pPVX), evitando assim a interferência na expressão dos sintomas dos genes do TSWV e para confirmar se o gene *NS_M* do TSWV isolado BR-01 é o possível fator de avirulência do gene *Sw-5*.

O estudo da indução da reação de hipersensibilidade foi realizado por meio de agroinfiltrações em plantas de *N. benthamiana*, expressando o gene *Sw-5b* e utilizando o vetor pEAQ-*HT* em conjunto com os genes individuais *N*, *NS_M*, *NS_S*, *GP*, *G_N* e *G_C* do TSWV isolado BR-01 e o gene *NS_M* do TSWV isolado GRAU. Não foi possível detectar nenhuma resposta de hipersensibilidade nas folhas agroinfiltradas com os genes de TSWV individualmente (Figura 4.7). Após 10 dias da agroinfiltração, sintomas de clorose eram visíveis nas folhas agroinfiltradas, sintomas esses, causados pela agroinfiltração com a agrobactéria LB4404 (Figura 4.7). Apenas o controle positivo, que consistiu de plantas de *N. benthamiana*, expressando o gene *Sw-5b*, quando inoculadas mecanicamente com o TSWV isolado BR-01, apresentou sintomas típicos de RH com, aproximadamente, nove dias, após a inoculação (Figura 4.7E). O isolado BR-01 foi utilizado como controle para que se pudesse fazer um acompanhamento da evolução dos sintomas de RH nas plantas agroinfiltradas.

A determinação da expressão das proteínas dos genes dos isolados BR-01 e GRAU (*NS_M*) utilizados no experimento foi feita por meio da técnica de Western blot, realizada com antissoro contra as proteínas *N*, *NS_M*, *NS_S*, *G_N* e *G_C* do TSWV. Os resultados mostraram que os genes *N* (Figura 4.8A), *NS_M* isolado Br-01 e GRAU (Figura 4.8C) e *NS_S* (Figura 4.8B) clonados no vetor pEAQ-*HT* GW, foram expressos. As proteínas *G_N*, *G_C* e *GP* não foram detectadas por meio Western blot (dados não mostrados). Na Figura 4.7E é possível observar os sintomas de manchas necróticas marrom-escuras nas folhas inoculadas mecanicamente

com o TSWV BR-01; com o passar dos dias essas manchas passam a apresentar no centro da lesão manchas pequenas escuras e arredondadas, do tipo RH.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 4.7: Sintomas de clorose causados pela agrobactéria LBA 4404 em plantas de *N. benthamiana* expressando o gene *Sw-5b*. (A) Vetor pEAQ-*HT* +N isolado BR-01; (B) Vetor pEAQ-*HT* + NS_S isolado BR-01; (C) Vetor pEAQ-*HT* + NS_M isolado BR-01; (D) Vetor pEAQ-*HT* + NS_M isolado GRAU; (E) Controle positivo – TSWV isolado BR-01 inoculado mecanicamente em *N. benthamiana* expressando o gene *Sw-5b*.

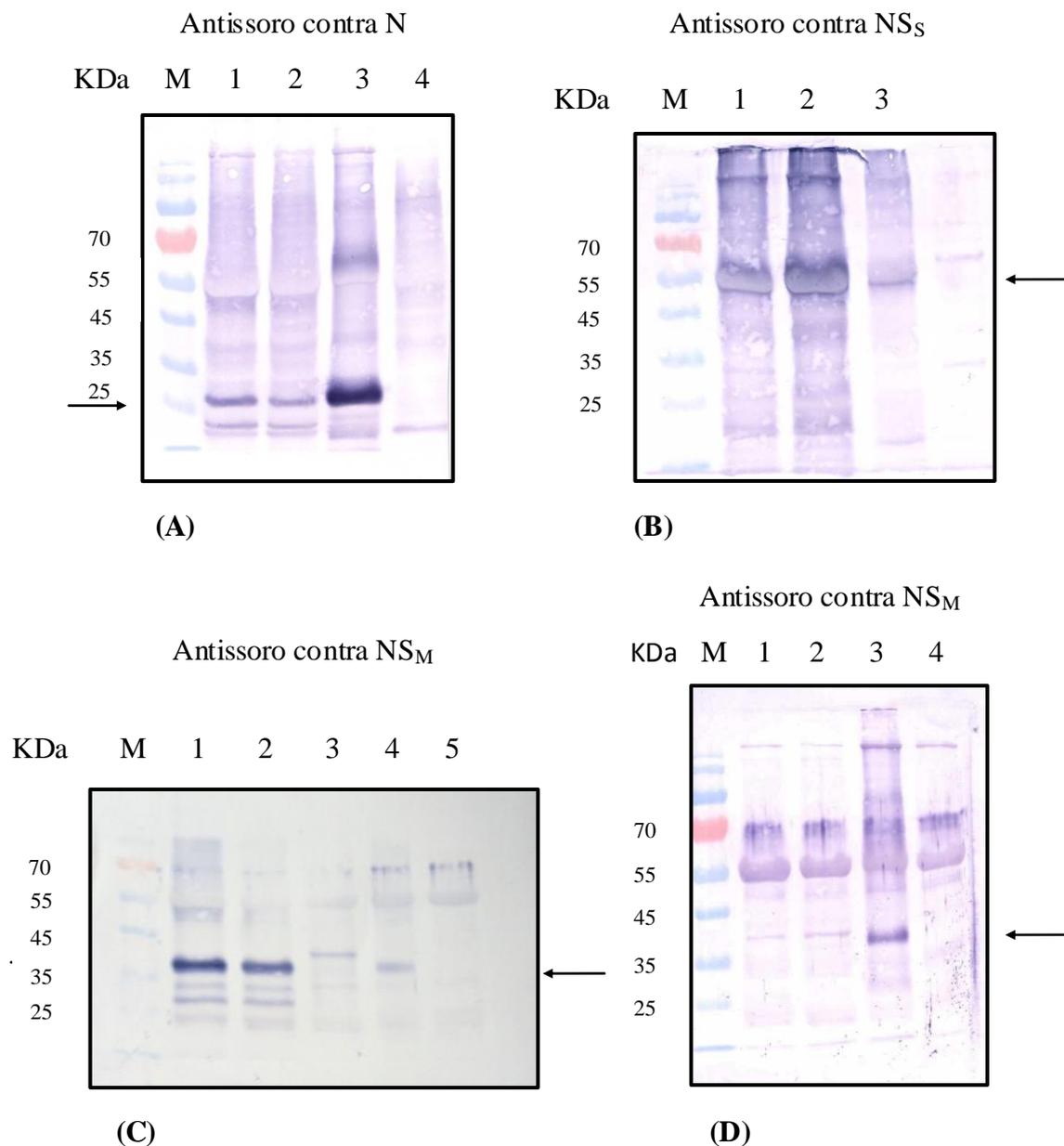


Figura 4.8: Expressão das proteínas NS_S, N, e NS_M isolado BR-01 e GRAU do TSWV, utilizando a técnica de Western blot. M = marcador de proteínas, KDa.

(A) Proteína N (28,9 KDa): Amostras 1 e 2) pEAQ-HT + N, 3) extrato de folhas infectadas com o vírus TSWV, 4) extrato de folhas saudias de *N. benthamiana*.

(B) Proteína NS_S (52,1 KDa): Amostras 1 e 2) pEAQ-HT + NS_S, 3) extrato de folhas infectadas com o vírus TSWV, 4) extrato de folhas saudias de *N. benthamiana*.

(C) Proteína NS_M (33,6 KDa): Amostras 1 e 2) pGR107 + NS_M isolado BR-01, 3) pEAQ-HT + NS_M isolado GRAU, 4) extrato de folhas infectadas com o vírus TSWV, 5) extrato de folhas saudias de *N. benthamiana*.

(D) Proteína NS_M: Amostras 1 e 2) - pEAQ-HT + NS_M isolado BR-01, 3) extrato de folhas infectadas com o vírus TSWV, 4) extrato de folhas saudias de *N. benthamiana*.

3.5 Ensaios de expressão em plantas de *N. benthamiana* transgênica por meio de co-infiltração de combinações dos vetores de expressão, contendo os genes *N*, *NS_M*, *NS_S*, *GP*, *G_N* e *G_C* do TSWV-BR-01

Como não foi possível observar sintomas similares a RH induzidos pelo vetor pEAQ-HT + *NS_M*, observado nos ensaios anteriores com a construção pGR107 + *NS_M* do isolado BR-01, co-infiltrações dos genes de TSWV isolado BR-01 foram realizadas utilizando-se várias combinações gênicas. O objetivo desse experimento foi avaliar se o gene de avirulência estava presente no segmento do RNA M do TSWV, para confirmar a observação de Hoffmann *et al.*(2001).

As co-infiltrações dos genes do TSWV isolado BR-01 não causaram nenhum sintoma distinto, apenas clorose, como foi observado no experimento anterior (Figura 4.7). No entanto, as proteínas N (Figura 4.9A), *NS_M* (Figura 4.9D) e *NS_S* (Figura 4.9B) puderam ser detectadas por Western blot, com exceção das glicoproteínas, as quais não foram detectadas por este método (Figura 4.9C). Vale destacar também, que a proteína *NS_M* apresentou um padrão de banda diferente, com a presença de duas bandas de diferente peso molecular (Figura 4.9D).

Os resultados mostraram que o gene *NS_M* e o precursor das glicoproteínas (presentes no M RNA) e os genes *N* e *NS_S* de TSWV isolado BR-01 não induziram a resposta de hipersensibilidade nas plantas de *N. benthamiana* transgênica, quando agroinfiltrados individualmente. Diferentes combinações dos genes, inoculados simultaneamente, também não foram capazes de induzir o mecanismo de RH.

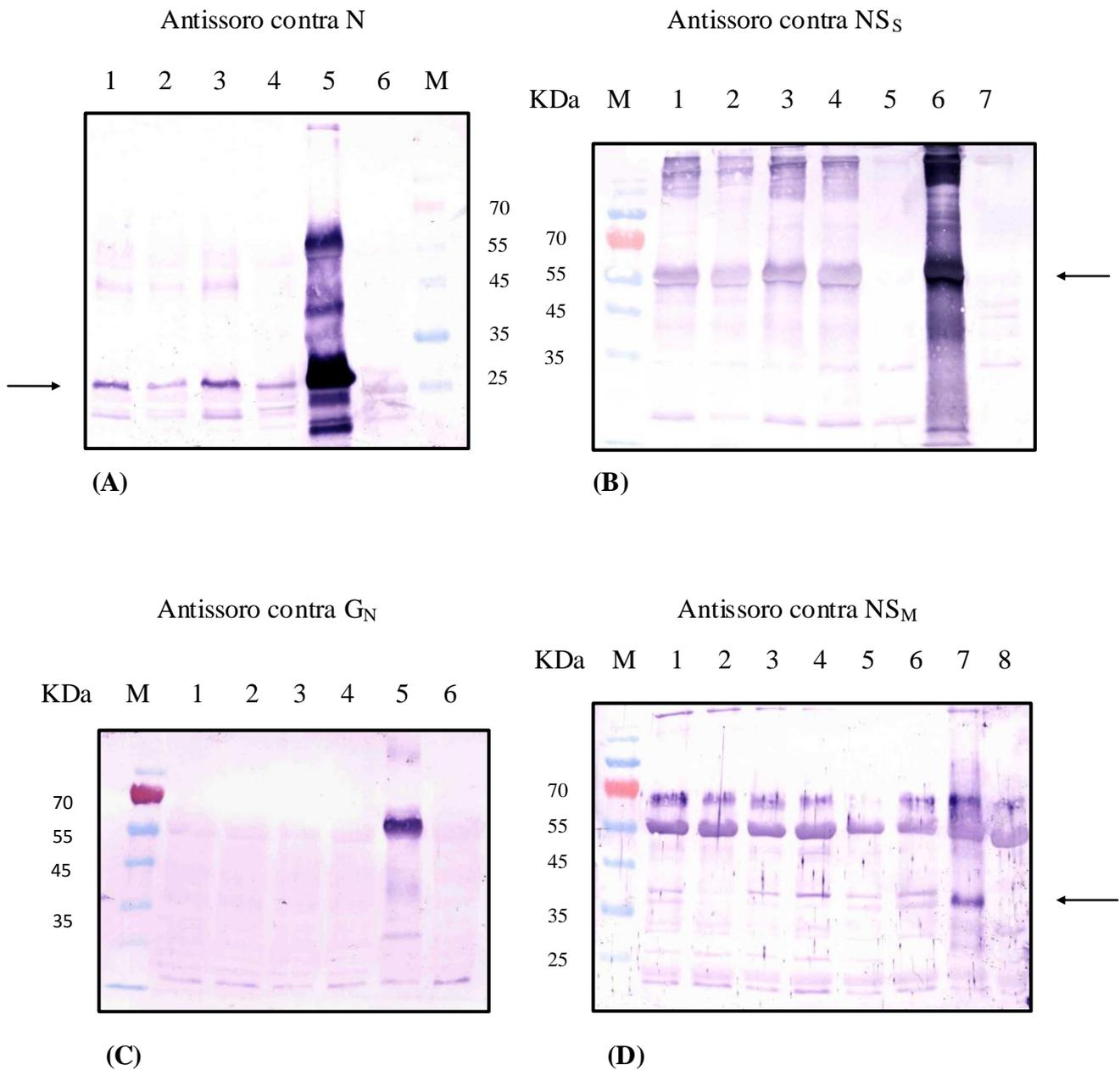


Figura 4.9: Avaliação da expressão das proteínas NS_S, N, NS_M e GP isolado BR-01 do TSWV, utilizando a técnica de Western blot. M = marcador de proteínas.

(A) Proteína N (28,9 KDa): 1) pEAQ-*HT* + N + pEAQ-*HT* + NS_M, 2) pEAQ-*HT* + N + pEAQ-*HT* + NS_S, 3) pEAQ-*HT* + N + pEAQ-*HT* + GP, 4) pEAQ-*HT* + N + pEAQ-*HT* + (NS_S, GP, NS_M), 5) extrato de de folhas infectadas com o vírus TSWV, 6) Controle negativo - folhas saudias de *N. benthamiana*.

(B) Proteína NS_S (52,1 KDa): 1) pEAQ-*HT* + NS_S + pEAQ-*HT* + N, 2) pEAQ-*HT* + NS_S + pEAQ-*HT* + NS_M, 3) pEAQ-*HT* + NS_S + pEAQ-*HT* + GP, 4) pEAQ-*HT* + NS_S + pEAQ-*HT* + (NS_M, N, GP), 5) Controle negativo - extrato de folhas saudias de *N. benthamiana*, 6) extrato

de folhas infectadas com o vírus TSWV, 7) Controle negativo – extrato de folhas sadias de *N. benthamiana*.

(C) Proteína GP (antissoro para G_N - 58 KDa): 1) pEAQ-*HT* + GP + pEAQ-*HT* + N, 2) pEAQ-*HT* + GP + pEAQ-*HT* + NS_M, 3) pEAQ-*HT* + GP + pEAQ-*HT* + NS_S, 4) pEAQ-*HT* + GP + pEAQ-*HT* + (NS_S, N, NS_M), 5) extrato de folhas infectadas com o vírus TSWV, 6) Controle negativo – extrato de folhas sadias de *N. benthamiana*.

(D) Proteína NS_M (33,6 KDa): 1) pEAQ-*HT* + NS_M + pEAQ-*HT* + N, 2) pEAQ-*HT* + NS_M + pEAQ-*HT* + NS_S, 3) pEAQ-*HT* + NS_M + pEAQ-*HT* + GP, 4) pEAQ-*HT* + NS_M, 5) pEAQ-*HT* + NS_M, 6) pEAQ-*HT* + NS_M + pEAQ-*HT* + (NS_S, N, GP), 7) extrato de folhas infectadas com o vírus TSWV, 8) Controle negativo – extrato de folhas sadias de *N. benthamiana*.

3.6 Co-infiltração das construções, contendo os genes *N*, *NS_S*, *NS_M*, *GP*, *G_N* e *G_C* de TSWV isolado BR-01 e *NS_M* isolado GRAU mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em combinação com o vetor pCGN + *Sw-5b*

Plantas de *N. benthamiana*, expressando o gene *Sw-5b* foram co-infiltradas com o vetor pEAQ-*HT*, contendo os genes individuais *N*, *NS_M*, *NS_S*, *GP*, *G_N* e *G_C* do TSWV isolado BR-01 e o gene *NS_M* do TSWV isolado GRAU em conjunto com o vetor pCGN+*Sw-5b*. Essa combinação foi usada, para verificar se ocorreria um silenciamento do gene *Sw-5b* ou uma alta expressão do mesmo.

Nenhuma resposta de hipersensibilidade foi visualizada nas plantas agroinfiltradas, foram observados apenas os sintomas de clorose causados pela bactéria LBA 4404, como descritos anteriormente (Figura 4.7).

4. Discussão

Hoffmann *et al.* (2001) verificaram que por meio de rearranjos dos RNAs de isolados do TSWV é possível superar a resistência conferida pelo gene *Sw-5* em tomate. Os autores observaram que a habilidade de superar a resistência estava associada com o RNA M, que codifica o precursor das glicoproteínas (G_N e G_C) e a proteína de movimento NS_M . Neste capítulo, foi descrita a ocorrência de sintomas semelhantes aos induzidos pela reação de hipersensibilidade (RH) em plantas de *Nicotiana benthamiana* transgênica agroinfiltradas com a construção pGR107+ NS_M isolado BR-01, sugerindo que a proteína NS_M é a elicitora da RH em plantas que expressam o gene *Sw-5*.

A RH em plantas é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões necróticas no sítio de infecção, que resulta no confinamento do patógeno nessa área. Ela é induzida por interações diretas e indiretas entre o gene de resistência da planta (*R*) e o gene de avirulência do patógeno (*Avr*). Diferentes proteínas virais, como a polimerase (Kim e Palukaitis, 1997; Erickson *et al.*, 1999), a proteína de movimento (Weber *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 1995; Yoshikawa *et al.*, 2006) e a proteína da capa (Bendahmane *et al.*, 2002; Asurmendi *et al.*, 2004) têm sido identificadas com determinantes de avirulência.

No presente trabalho, observou-se que a agroinfiltração das construções pGR107 + N, pGR107 + NS_S e pGR107 + NS_M isolado GRAU em *N. benthamiana* transgênica não causaram nenhum sintoma distinto ao gerado pela agroinfiltração com o controle pGR107. Enquanto que a construção pGR107 + NS_M isolado BR-01, com cinco dias após a agroinfiltração, apresentou sintomas de lesões necróticas, típico de RH (Figura 4.5C), semelhante ao que foi observado na planta de *N. benthamiana* transgênica inoculada mecanicamente com o TSWV isolado BR-01 (Figura 4.7E). As diferenças no padrão das lesões necróticas geradas pelo vetor pGR107 + NS_M e o vírus selvagem TSWV, provavelmente, estão ligadas a forma de dispersão do vetor PVX no hospedeiro transgênico comparado ao padrão de movimentação do TSWV.

O vetor de expressão transiente pEAQ-*HT* foi utilizado neste trabalho, visando eliminar os sintomas necróticos típicos do PVX produzidos em *N. benthamiana*, aliado a esse fator, o vetor pEAQ-*HT* ainda permite a expressão de vários polipeptídeos em um único plasmídeo em poucos dias e além de poder ser usado pelo sistema Gateway de recombinação (Sainsbury *et al.*, 2009). As construções recombinantes pEAQ-*HT* + N, pEAQ-*HT* + NS_M , pEAQ-*HT* + NS_S , pEAQ-*HT* + GP, pEAQ-*HT* + G_N e pEAQ-*HT* + G_C do TSWV isolado BR-01 e pEAQ-*HT* + NS_M do TSWV isolado GRAU foram agroinfiltradas nas plantas de *N.*

benthamiana transgênica, porém, nenhum sintoma viral foi observado, apenas sintomas de clorose causados pela cepa de agrobactéria LBA 4404. Co-infiltrações, a partir da combinação das construções com o vetor pEAQ-*HT*, com base nos resultados observados por Hoffmann *et al.* (2001), de que o fator de avirulência do gene *Sw-5* está presente no RNA M também não mostraram um resultado diferente. A perfeita clonagem dos genes nos diversos vetores foi confirmada com a determinação da sequência de nucleotídeos da região de clonagem. As proteínas N, NS_M do isolado GRAU e NS_S foram detectadas por Western blot, enquanto que o precursor das glicoproteínas e as glicoproteínas G_N e G_C não foram detectadas pelo método, talvez pela baixa concentração expressa por essas construções. No entanto, como as glicoproteínas G_N e G_C estavam fusionadas a uma proteína de fluorescência, foi possível observar nas folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas regiões com fluorescência (dados não mostrados), indicando que as proteínas estavam sendo expressas.

Usando a construção pEAQ-*HT* + NS_M, a proteína NS_M do isolado BR-01 foi detectada na forma truncada, sendo visualizadas duas bandas no Western blot, podendo explicar o não surgimento de sintomas de necrose nas plantas agroinfiltradas com a construção pEAQ-*HT* + NS_M. A seleção de um novo clone da construção pEAQ-*HT* + NS_M possibilitaria testar, novamente, as agroinfiltrações nas plantas transgênicas para confirmar o resultado observado nas agroinfiltração com o vetor pGR107 + NS_M. Portanto, o experimento, utilizando as construções pEAQ-*HT* + NS_M isolado BR-01 e pEAQ-*HT* + NS_M isolado GRAU precisa ser repetido em tomate, contendo o gene *Sw-5* para que se possa confirmar o que foi observado nas plantas de *N. benthamiana*, expressando o gene *Sw-5b*, mas utilizando um novo clone do gene NS_M.

Outra hipótese seria que, ao se usar um vetor viral, é possível que ocorra uma interação da proteína NS_M com alguma proteína do vetor, permitindo a movimentação do vírus e expressão da proteína NS_M, causando a indução de sintomas do tipo RH. Essa associação da proteína NS_M, com outras proteínas do hospedeiro, é esperada durante a infecção viral causada pelo TSWV. Como exemplo, temos a formação de túbulos pela proteína NS_M, por meio de modificações dos plasmodesmas, o que permite a movimentação do vírus célula-a-célula. O mesmo comportamento pode ser esperado com a construção pGR107 + NS_M, o que levaria à expressão dos sintomas do tipo RH, fato que não ocorreria com a expressão da proteína NS_M por meio do vetor pEAQ-*HT* + NS_M. Zhang *et al.* (2011) expressaram a proteína N do TSWV em plantas de *N. benthamiana* transgênica (expressando uma cópia da proteína de movimento do TMV NB-MP+), para isso eles clonaram o gene N

do TSWV no vetor viral TMV (*Tobacco mosaic virus*). Os autores observaram a movimentação do vírus a longas distâncias e também a expressão de sintomas locais nas plantas inoculadas com a construção, semelhante ao que foi observado neste trabalho com a construção pGR107 + NS_M. Estudos mais detalhados na associação da proteína NS_M com outros fatores virais ou do hospedeiro necessitam ser desenvolvidos para comprovar essa hipótese.

López *et al.* (2011), por meio de análises de sequências, identificaram o gene NS_M do TSWV como sendo o provável fator de avirulência para o gene *Sw-5* devido à presença consistente de mutações gênicas neste gene, em isolados que superavam a resistência do gene *Sw-5*. Os autores sugeriram que a resistência conferida pelo gene *Sw-5* pode ser superada pela substituição dos aminoácidos cisteína (C) pela tirosina (Y) na posição 118 (C118Y) ou pela substituição dos aminoácidos treonina (T) pela asparagina (N) na posição 120 (T120N), na proteína de movimento NS_M. A substituição C118Y seria uma adaptação para superar a resistência conferida pelo gene dominante *Sw-5*. Os autores também sugeriram que para um isolado ser responsável pela quebra de resistência, ele tem que conter os aminoácidos 118Y e 120T ou 118C e 120N. Isolados que apresentavam os aminoácidos 118C e 120T não induziram a quebra de resistência, para que isso ocorra seria necessário que o isolado apresentasse, pelo menos, uma substituição no códon 118 ou 120. O primeiro experimento realizado neste trabalho, utilizando a construção pGR107 + NS_M isolado BR-01 em plantas de *N. benthamiana* transgênica indicou que o gene NS_M, de fato, pode ser o fator de avirulência do gene de resistência a tospovírus em tomate, expressando o gene *Sw-5*, corroborando com os resultados observados por López *in silico*.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ao se comparar as espécies de tospovírus, atualmente identificadas, observa-se que algumas têm uma distribuição mundial, como o TSWV e o INSV, enquanto outras são confinadas a algumas regiões geográficas. Além disso, algumas regiões abrigam mais tospovírus que outras, como o Continente Sul Americano e a Ásia.

No Capítulo 2 deste trabalho, foram determinadas as sequências de nucleotídeos da região 5' não traduzida e do gene *NS_S* das espécies de tospovírus GRSV e ZLCV. A diferença nas sequências de aminoácidos pode ser observada entre os isolados de GRSV e ZLCV, que apresentam 69,6% de identidade. As duas espécies diferem biologicamente, na transmissão por espécies distintas de trips e pela distinção do espectro de plantas hospedeiras. O ZLCV é restrito às cucurbitáceas, não tendo sido relatado ainda em outras plantas hospedeiras. As análises filogenéticas foram realizadas com base no alinhamento das sequências de aminoácidos da N e *NS_S* do GRSV e ZLCV com a dos tospovírus disponíveis no banco de dados. As duas árvores construídas mostraram a formação de dois grupos: um grupo formado por tospovírus da Europa e da Ásia e outro, formado pelos tospovírus americanos. As sequências de aminoácidos das proteínas N e *NS_S* de GRSV e ZLCV agruparam-se com os tospovírus originários do Continente Americano, como era esperado. A proteína *NS_S* está relacionada à supressão do silenciamento gênico em plantas, causada pela infecção por TSWV e por GBNV e também está relacionada à interação vírus/hospedeiro e expressão de sintomas em plantas infectadas. Os resultados produzidos serão importantes em experimentos de análise de expressão das proteínas e na produção de anti-soro contra a *NS_S* do GRSV, usados para fins de detecção.

Nos últimos anos, tem ocorrido um progresso considerável no conhecimento sobre a regulação gênica durante as respostas imunes de plantas. As informações geradas com o sequenciamento de genomas têm contribuído para a elucidação dos mecanismos que controlam as interações planta/patógeno.

A descoberta da reação de hipersensibilidade (RH) ao TSWV em *Capsicum chinense* conduziu a estudos em busca do fator de avirulência do TSWV. Lovato *et al.* (2008) observaram sintomas típicos de RH em plantas de *C. chinense* inoculadas com a construção pGR107+N. Os resultados obtidos por Lovato *et al.* (2008) levaram ao desenvolvimento do trabalho descrito no Capítulo 3. Quimeras contendo partes dos genes N de TSWV e TCSV foram construídas com o objetivo de investigar o domínio da proteína N envolvido na indução

de sintomas do tipo RH em *C. chinense*. Nenhum sintoma do tipo RH pode ser observado devido à incompatibilidade que ocorreu entre a cepa de *Agrobacterium* utilizada e as plantas de *C. chinense*. As construções obtidas deverão ser transformadas em uma nova cepa de *Agrobacterium*, para que os sintomas de necrose gerados pela cepa incompatível não se manifestem, e também para que experimentos adicionais possam comprovar a descoberta do gene de avirulência do TSWV elicitor de RH em *C. chinense*. Várias técnicas poderão ser usadas para este fim, como: marcação do DNA fragmentado, visualização do DNA fragmentado por microscopia de fluorescência, coloração das amostras (após tratamento com etanol para remover a clorofila) com azul de tripano e observação dos sintomas por microscopia de luz.

No capítulo 4, foram observados os efeitos da expressão dos genes do TSWV em plantas de *N. benthamiana* que expressam uma cópia funcional do gene *Sw-5b* de tomate, visando à identificação do gene de avirulência do TSWV responsável por elicitar a RH. Os resultados obtidos, com base na sintomatologia, indicaram que o gene *NS_M* é o provável elicitor de RH em *N. benthamiana* transgênica. As informações geradas neste capítulo permitirão a condução de experimentos adicionais, como a seleção de um novo clone da construção pEAQ-*HT* GW + *NS_M* para se testar em plantas de tomate expressando que expressam o gene *Sw-5*. A marcação do DNA fragmentado, com o uso do kit TUNEL também pode ser usado nos experimentos futuros.

A descoberta das proteínas envolvidas no processo de interação planta/patógeno representa um começo para a elucidação das vias de transdução de sinais envolvidas nesse processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, N. *et al.* Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 95, p. 10306-10311, 1998.
- ADKINS, S. *et al.* An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of *Tomato spotted wilt virus*, a plant- and insect-infecting bunyavirus. *Virology*, v. 207, n. 1, p. 308-311, 20 1995.
- ADRIN, C.; MARTIN, S. J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *seas*. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 26, p. 390-397, 2001.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*, v. 8, p. 1683-1698, 1996.
- ALLEN, I. C. *et al.* The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to *Influenza A* virus through recognition of viral RNA. *Immunity*, v. 30, p. 556-565, 2009.
- ARAMBURU, J.; MARTI, M. The occurrence in north-east spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. *Plant Pathol*, v. 52, p. 407, 2003.
- ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. *Proteins*, v. 46, p. 355-367, 2002.
- ASURMENDI, S. *et al.* Coat protein regulates formation of replication complexes during *Tobacco mosaic virus* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 1415-1420, 2004.
- AYME, V. *et al.* Different mutations in the VPg of *Potato virus Y* confer virulence on the *pvr23* resistance in pepper. *Mol. Plant Microbe Interact*, v. 19, p. 557-563, 2006.
- AYME, V. *et al.* Molecular dissection of the *Potato virus Y* VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 1594-1601, 2007.
- BANDLA, M. D. *et al.* Interaction of *Tomato Spotted Wilt Tospovirus* (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology*, v. 88, n. 2, p. 98-104, Feb 1998.
- BAURES, I. *et al.* The *Rx* gene confers resistance to a range of potexviruses in transgenic *Nicotiana* plants. *Mol. Plant-Microbe Interact*, v. 21, p. 1154-1164, 2008.
- BENDAHMANE, A. *et al.* Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: Application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J*, v. 21, p. 73-81, 2000.

- BENDAHMANE, M. *et al.* Characterization of mutant *Tobacco mosaic virus* coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 3645-3650, 2002.
- BERTRAN, A. G. *et al.* Molecular characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from *Groundnut ringspot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Arch Virol*, v. 156, n. 8, p. 1425-1429, 2011.
- BEST, R. J.; GALLUS, H. P. C. Strains of *Tomato spotted wilt virus*. *Australian Journal of Science*, v. 15, p. 212-214, 1955.
- BEZERRA, I. C. *et al.* 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.
- BLACK, L. L. *et al.* *Tomato spotted wilt virus* resistance in *Capsicum chinense* 'PI 152225' and 'PI 159236'. *Plant Disease*, v. 75, p. 863, 1991.
- BLACK, L. L. *et al.* Resistance of *Capsicum chinense* lines to *Tomato spotted wilt virus* from Louisiana, USA, and inheritance of resistance. *Acta Horticulturae*, p. 431, 1996.
- BOITEUX, L. S. *et al.* Sources of resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. *Euphytica*, v. 67, p. 89-94, 1993.
- BOITEUX, L. S. Allelic relationships between genes for resistance to *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum chinense*. *Theoretical Applied Genetics*, v. 90, p. 146-149, 1995.
- BOITEUX, L. S.; DE ÁVILA, A. C. Inheritance of a resistance specific to *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum chinense* 'PI 159236'. *Euphytica*, v. 75, p. 139-142, 1994.
- 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.
- BRAS, M. *et al.* Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v. 70, p. 231-39, 2005.
- BRENNAN, M. A.; COOKSON, B. T. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol*, v. 38, p. 31-40, 2000.
- BRIOSO, P. S. T. *et al.* Ocorrência de *Chrysanthemum stem necrosis virus*, em crisântemo, no estado do Rio de Janeiro. *Tropical Plant Pathology* antiga *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 140, 2004.
- BRITTLEBANK, C. C. A new tomato disease spotted wilt. *Journal of Agriculture Victoria*, v. 27, p. 231-235, 1919.
- BROMMONSCHENKEL, S. H.; TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. *Mol Gen Genet*, v. 256, n. 2, p. 121-126, 1997.

- BROMMONSCHENKEL, S. H. *et al.* The broadspectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the rootknot nematode resistance gene *Mi*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, v. 13, p. 1130-1138, 2000.
- BUCHER, E. *et al.* Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J Virol*, v. 77, n. 2, p. 1329-1336, 2003.
- CANADY, M. A. *et al.* Tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. *Euphytica*, v. 117, p. 19-25, 2001.
- CHAGUE, V. *et al.* Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theor Appl Gen*, v. 92, p. 1045–1051, 1996.
- CHALLA, S.; CHAN, F. K. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci*, v. 67, p. 3241-3253, 2010.
- CHAPMAN, S. *et al.* Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J*, v. 2, n. 4, p. 549-557, 1992.
- CHAPMAN, E. *et al.* Association of L protein and in vitro *Tomato spotted wilt virus* RNA-dependent RNA polymerase activity. *Intervirology*, v. 46, n. 3, p. 177-181, 2003.
- CHICHKOVA, N. V. *et al.* A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell*, v. 16, p.157-171, 2004.
- CHO, J. J. *et al.* A multidisciplinary approach to management of *Tomato spotted wilt virus* in Hawaii. *Plant Disease*, v.73, p.375-383, 1989.
- CIUFFO, M. *et al.* First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw5* resistance gene. *Plant Pathol*, v. 54, p. 564, 2005.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characterization of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, v. 34, p. 475-483, 1977.
- CLARKE, P. G. H.; CLARKE, S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol*, v. 193, p. 81-99, 1996.
- COLL, N. S. *et al.* Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation*, p. 1-10, 2011.
- COOLEY, M. B. *et al.* Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell*, v. 12, p. 663-676, 2000.
- COORNAERT, B. *et al.* T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat Immunol*, v. 9, p. 263-271, 2008.

- COOPER, D. *et al.* Multi-virus resistance in transgenic tobacco plants expressing a dysfunctional movement protein of tobacco mosaic. *Virology*, v. 206, p. 307-313, 1995.
- COUTTS, B. A. *et al.* Patterns of spread of *Tomato spotted wilt virus* in field crops of lettuce and pepper: spatial dynamics and validation of control measures. *Ann Appl. Biol*, v. 154, p. 231-245, 2004.
- DANGL, J. L. *et al.* Senescence and programmed cell death. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville : American Society of Plant Physiologists, p. 1044-1100, 2000.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, v. 411, p. 826-833, 2001.
- DAWSON, W. O. *et al.* A Tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology*, v. 172, p. 285-292, 1989.
- DE AVILA, A. C. *et al.* Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 153-9, 1993.
- DE AVILA, A. C. *et al.* Serological differentiation of twenty isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 2801-2807, 1990.
- DEGTEREV, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, v. 1, p. 112-119, 2005.
- DE HAAN, P. *et al.* The S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 1001, 1990.
- DE HAAN, P. *et al.* *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 2207, 1991.
- DE HAAN, P. *et al.* The nucleotide sequence of the S RNA of *Impatiens necrotic spot virus*, a novel tospovirus. *FEBS Lett*, v. 306, n. 1, p. 27-32, 1992.
- DE OLIVEIRA, A. S. *et al.* An RNA-dependent RNA polymerase gene of a distinct Brazilian tospovirus. *Virus Genes*, v. 43, n. 3, p. 385-389, 2011. 121p.
- DIANESE, E. C. *Estratégias para obtenção de resistência ampla e duradoura a tospovírus e potyvirus em acesso de Solanum (Secção Lycopersicon)*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, UnB, 2009.
- DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: Morse, S. S. (ed.) *The evolutionary biology of viruses*. Raven Press, New York, p. 161-183, 1994.
- DUIJSINGS, D. *et al.* In vivo analysis of the TSWV cap-snatching mechanism: inle basse complementarity and primer length requirements. *EMBO J*, v. 20, p. 2545-2552, 2001.

- ELLIOT, R. M. Evolution of the *Bunyaviridae*. In: Gibbs, A. J., Calisher, C. H., Garcia-Arenal, F. (eds.). *Molecular basis of virus evolution*. Cambridge Univ. Press, NY, p. 321-337, 1995.
- EL-WAHAB, A. *et al.* First record in Egypt of thrips *Frankliniella occidentalis* and *Impatiens necrotic spot tospovirus*. International Conference 2008. *Diversifying Crop protection*, La Grande Motte, France, p. 12-15, 2008. In: PAPPU, H. R.; JONES, R. A. C.; JAIN, R. K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, v. 141, p. 219-236, 2009.
- ERICKSON, F. L. *et al.* The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J*, v. 18, p. 67-75, 1999.
- FAUQUET, C. M. *et al.* Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, London, 1259 p, 2005.
- FILONOVA, L. H. *et al.* Detection of programmed cell death in plant embryos. *Methods Mol Biol*, v. 427, p. 173-179, 2008.
- FINETTI-SIALER, M. M. *et al.* Occurrence of two distinct *Tomato spotted wilt virus* subgroups in Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, v. 84, p. 145-152, 2002.
- FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review Phytopathology*, v. 9, p. 275-296, 1971.
- FONTANA, J. *et al.* The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol*, v. 10, n. 10, p. 2012-2028, 2008.
- FRANCKI, R. I. *et al.* Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*, Supplementum 2, 1991.
- FU, Z. Q. *et al.* A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature*, v. 447, p. 284-288, 2007.
- GARCÍA-ARENAL, F.; MC DONALD, B. A. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology*, v. 93, p. 941-952, 2003.
- GARCIA-CANO, E. *et al.* Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology*, v. 96, p. 1263-1269, 2006.
- GIBBS, A. *et al.* Viruses of orchids in Australia, their identification, biology and control. *Aust Orchid Rev*, v. 65, p. 10-21, 2000.
- GOLDBACH, R.; KUO, G. International Symposium on Tospoviruses and Thrips of Floral and Vegetable Crops. *Acta Horticulturae*, v. 431, p. 21-26, 1996.
- GIORDANO, L. B. *et al.* 'Viradoro': A Tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. *HortScience*, v. 35, p. 1368-1379, 2000.

- GORDILLO, L. F. *et al.* Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to Tomato spotted wilt virus. *Plant Dis*, v. 92, p. 694-704, 2008.
- GOSWAMI, S. *et al.* Interference in plant defense and development by non-structural protein NSs of Groundnut bud necrosis virus. *Virus Res*, 2011.
- GOVRIN, E. M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol*, v. 10, p. 751-757, 2000.
- GREEN, D. R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, v. 281, p. 1309-1312, 1998.
- GREENBERG, J. T. Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, v. 48, p. 525-545, 1997.
- GREGERSEN, P. L. *et al.* Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology*, v. 10, Supplement 1, p. 37-49, 2008.
- GUO, M. *et al.* The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 can suppress plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 22, p. 1069-1080, 2009.
- GUTTMAN, D. S. *et al.* A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science*, v. 295, p. 1722-1726, 2002.
- HAJIMORAD, M. R. *et al.* Loss and gain of elicitor function of *Soybean mosaic virus G7* provoking Rsv1-mediated lethal systemic hypersensitive response maps to P3. *J. Virol*, v. 79, p. 1215-1222, 2005.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, v. 8, p. 1773-1791, 1996.
- HAO, L. *et al.* Expression of a metacaspase gene of *Nicotiana benthamiana* after inoculation with *Colletotrichum destructivum* or *Pseudomonas syringae* pv. tomato, and the effect of silencing the gene on the host response. *Plant Cell Rep*, v. 26, p. 1879-1888, 2007.
- HARRISON, B. D. Virus variation in relation to resistance breaking in plants. *Euphytica*, v. 124, p. 181-192, 2002.
- HASSANI-MEHRABAN, A. *et al.* A new tomato-infecting tospovirus from Iran. *Phytopathology*, v. 95, n. 8, p. 852-858, 2005.
- HASSANI-MEHRABAN, A. Virus-host interactions of Tomato yellow ring virus, a new Tosposvirus from Iran. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. 2008. 130 p.
- HASSANI-MEHRABAN, A. *et al.* Tomato necrotic ring virus (TNRV), a recently described tospovirus species infecting tomato and pepper in Thailand. *European Journal of Plant Pathology*, v. 130, n. 4, p. 449-456, 2011.

- HATSUGAI, N. *et al.* A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, v. 305, p. 855-858, 2004.
- HAYES, A. J. *et al.* Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to *Soybean mosaic virus* in soybeans. *Genetics*, v. 166, p. 493-503, 2004.
- HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, London, v. 3, n. 4, p. 315-319, 2000.
- HELLENS, R. P. *et al.* Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, v. 1, p. 1-13, 2005.
- HIGGINS, D. G. *et al.* CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci*, v. 8, p. 189-191, 1992.
- HOFFMAN, K. *et al.* Overcoming-host and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of *Tomato spotted wilt virus*. *Mol Plant-Microbe Interact*, v. 14, n. 2, p. 242-249, 2001.
- HUISMAN, M. J. *et al.* The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *Journal of General Virology*, v. 69, p. 1789-1798, 1988.
- HWANG, I. S.; HWANG, B. K. The pepper mannose-binding lectin gene *CaMBL1* is required to regulate cell death and defense responses to microbial pathogens. *Plant Physiology*, v. 155, p. 447-463, 2011.
- JAHN, M. *et al.* 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. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 13, n. 6, p. 673-682, 2000.
- JAIN, R. K. *et al.* Natural infection by tospovirus of cucurbitaceous and fabaceous vegetable crops in India. *J. Phytopathol*, v. 155, p. 22-25, 2007.
- JAMIR, Y. *et al.* Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J*, v. 37, p. 554-565, 2004.
- JELENSKA, J. *et al.* A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr Biol*, v. 17, p. 499-508, 2007.
- JONES J. D.; DANGL J. L. The plant immune system. *Nature*, v.444, p. 323–329, 2006.
- KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plantpathogen interactions. *Annu Rev Genet*, v. 24, p. 447-463, 1990.
- KERR, J. F. *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* , v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

- KIKKERT, M. *et al.* Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. *J Virol*, v. 73, n. 3, p. 2288-2297, 1999.
- KIM, C. H.; PALUKAITIS, P. The plant defense response to *cucumber mosaic virus* in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO J*, v. 16, p. 4060-4068, 1997.
- KORMELINK, R. *et al.* 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, n. 2, p. 459-468, 1991.
- KORMELINK, R. *et al.* The nucleotide sequence of the M RNA segment of *tomato spotted wilt virus*, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J Gen Virol*, v. 73, p. 2795-2804, 1992a.
- KORMELINK, R. *et al.* Viral RNA synthesis in *Tomato spotted wilt virus*-infected *Nicotiana rustica* plants. *J Gen Virol*, v. 73, p. 687-693, 1992b.
- KORMELINK, R. *et al.* Expression and subcellular location of the NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*, v. 200, n. 1, p. 56-65, 1994.
- KRITZMAN, A. *et al.* A *Lisianthus* leaf necrosis: A new disease of *lisianthus* caused by Iris yellow spot virus. *Plant Disease*, v. 84, p. 1185-1189, 2000.
- KROEMER, G. *et al.* 2009. Classification of cell death. Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, v. 16, p. 3-11, 2009.
- LABBE, K.; SALEH, M. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ*, v. 15, p. 1339-1349, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1990.
- LAM, E.; DEL POZO, O. Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol*, v. 44, p. 417-428, 2000.
- LANFERMEIJER, F. C. *et al.* Cloning and characterization of the durable *Tomato mosaic virus* resistance gene *Tm-2(2)* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol. Biol*, v. 52, p. 1037-1049, 2003.
- LANFERMEIJER, F. *et al.* The products of the broken *Tm-2* and the durable *Tm-2(2)* resistance genes from tomato differ in four amino acids. *J. Exp. Bot*, v. 56, p. 2925-2933, 2005.
- LAU, D. *et al.* Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene de resistência *Sw-5* de tomateiro. *Tropical Plant Pathology* antiga *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p.247-253, 2006.

- LAW, M. D.; MOYER, J. W. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *J Gen Virol*, v. 71, p. 933-938, 1990.
- LAW, M. D. *et al.* The M RNA of *Impatiens necrotic spot* Tospovirus (*Bunyaviridae*) has an ambisense genomic organization. *Virology*, v. 188, n. 2, p. 732-741, 1992.
- LEASTRO, M. O. Uma abordagem Biológica e Molecular do *Zucchini lethal chlorosis*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, UnB. 2011. 76 p.
- LEBAS, B. S. M., OCHOA-CORONA, F. M. *Impatiens necrotic spot virus*. In: RAO, G.P., BRAGARD, C., LEBAS, B.S.M. *Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses*. Vol. 4: Grain Crops and Ornamentals. Stadium Press LLC, Texas, p. 221-243, 2007.
- LEFEBVRE, D. D, *et al.* Mammalian metallothionein functions in plants. *Biotechnology*, v. 5, p. 1053-1056, 1987.
- LENNON, S. V. *et al.* Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation*, v. 24, p. 203-214, 1991.
- LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: Origins of the theory. *Nature Reviews Mol Cell Bio.* v. 2, p. 544-550, 2001.
- LOKESH, B. *et al.* NSs encoded by *Groundnut bud necrosis virus* is a bifunctional enzyme. *PLoS One*, v. 5, n. 3, p. 9757, 2010.
- LOPEZ, C. *et al.* Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *J Gen Virol*, v. 92, p. 210-215, 2011.
- LOVATO, F. A. *et al.* Sequence analysis of the glycoproteins of *Tomato chlorotic spot virus* and *Groundnut ringspot virus* and comparison with other tospoviruses. *Virus Genes*, v. 29, n. 3, p. 321-328, 2004.
- LOVATO, F. A. *et al.* The N protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in *Capsicum chinense* plants, a hypersensitive host to TSWV infection. *Virus Res*, v. 137, n. 2, p. 245-252, 2008.
- MAN, M.; EPEL, B. L. Assessment of the effectiveness of a nuclear-launched TMV-based replicon as a tool for foreign gene expression in plants in comparison to direct gene expression from a nuclear promoter. *Transgenic Res*, v.15, p. 107-113, 2006.
- MARGARIA, P. *et al.* Resistance breaking strains of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus-Bunyaviridae*) on resistant pepper cultivars in Almeria (Spain). *Plant Pathol*, v. 53, p. 795, 2004.
- MARGARIA, P. *et al.* Evidence that the nonstructural protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the *Tsw* gene. *Mol Plant-Microbe Interact*, v. 20(5), p. 547-558, 2007.

- MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*, v. 14, p. 10-22, 2007.
- MATSUURA, S. *et al.* First report of *Chrysanthemumstem necrosis virus* on Chrysanthemum in Japan. *Plant Disease*, v. 91, p. 468, 2007.
- MATTHEWS, R. E. F. Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, v. 12, p. 129-296, 1979.
- MC MICHAEL, L. *et al.* A new tospovirus serogroup IV species infecting capsicum and tomato in Queensland, Australia. *Plant Pathology*, v. 31, p. 231-239, 2002.
- MEYERS, B. C. *et al.* Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotidebinding superfamily. *Plant J*, v. 20, p. 317-332, 1999.
- MILNE, R. G.; FRANCKI, R. I. Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae? *Intervirology*, v. 22, n. 2, p. 72-76, 1984.
- MOFFETT, P. Mechanisms of recognition in dominant *R* gene mediated resistance. *Adv Virus Res*, v. 75, p. 1-33, 2009.
- MOREL, J. B.; DANGL, J. L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ*, v. 4, p. 671-683, 1997.
- MUMFORD, R. A. *et al.* First record of *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) in the UK. *Plant Pathology*, v. 52, p. 779, 2003.
- MUR, L. A. *et al.* The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*, v. 59, p. 501-520, 2008.
- NAGATA, T. *et al.* Occurrence of different tospoviruses in six states of Brazil. *Tropical Plant Pathology antiga Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 90-95, 1995.
- NAGATA, T. *et al.* First report of natural occurrence of Zucchini lethal chlorosis tospovirus on cucumber and chrysanthemum stem necrosis tospovirus on tomato in Brazil. *Plant Disease*, v. 82, p.1403, 1998.
- NAGATA, T. *et al.* Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for Tomato spotted wilt tospovirus. *J Gen Virol*, v. 80, p. 507-515, 1999a.
- NAGATA, T. *et al.* Identification and rearing of four thrips species vectors of Tospovirus in the Federal District, Brazil. *Anais de Entomologia da Sociedade Brasileira*, v. 28, p. 535-539, 1999b.
- NAGATA, T. *et al.* Factors determining vector competence and specificity for transmission of *Tomato spotted wilt virus*. *J Gen Virol*, v. 83, n. 3, p. 663-671, 2002.

- NAKAHARA, S.; MONTEIRO, R. C. *Frankliniella zucchini* (Thysanoptera: Thripidae), a new species and vector of tospovirus in Brazil. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, v. 101, n. 2, p. 290-294, 1999.
- NYKANEN, A. *et al.* ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, v. 107, n. 3, p. 309-321, Nov 2001.
- OLIVEIRA, V. C. *et al.* A silencing suppressor protein (NSs) of a tospovirus enhances baculovirus replication in permissive and semipermissive insect cell lines. *Virus Res*, v. 155, p. 259-267, 2011.
- PADGETT, H. S.; BEACHY, R. N. Analysis of a *Tobacco mosaic virus* strain capable of overcoming N gene-mediated resistance. *Plant Cell*, v. 5, p. 577-586, 1993.
- PAN, Q. L. *et al.* Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.*, v. 50, p. 203-213, 2000.
- PANG, S. Z. *et al.* The biological properties of a distinct tospovirus and sequence analysis of its S RNA. *Phytopathology*, v. 83, p. 728-733, 1993.
- PAPPU, H. R. *et al.* Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Res*, v. 141, n. 2, p. 219-236, 2009.
- PARRELA, G. *et al.* An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*, v. 85, p. 227-264, 2003.
- PATERSON, R. G. *et al.* Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of *Tomato spotted wilt virus*. *Euphytica*, v. 43, p. 173-178, 1989.
- PENNELL, R. I.; LAMB, C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, v. 9, p. 1157-1168, 1997.
- PETERS, D. *et al.* An overview of *Tomato spotted wilt virus*. *Virus-Thrips-Plant Interactions of Tomato Spotted Wilt Virus*, v. 84, p. 1-14, 1991.
- PETERS, D. *et al.* Vector relations in the transmission and epidemiology of tospoviruses. *Acta Hort.* v. 431, p. 29-43, 1996.
- PETERS, D. An updates list of plant species susceptible to tospoviruses. In: PETERS, D. AND GOLDBACH, R (eds.). *Recent progress in Tospovirus and Thrips Rresearch*. Wageningen, The Netherlands: p. 107-110, 1998.
- PIETERSEN, G.; MORRIS, J. Natural occurrence of *Groundnut ringspot virus* on soybean in South Africa. *Plant Disease*, v. 86, p. 1271-1271, 2002.
- POZZER, L. *et al.* Tospovirus: uma visão atualizada. *Revisão Anual em Patologia de Plantas*, v. 4, p. 95-148, 1996.
- POZZER, L. *et al.* Characterization of a tospovirus isolate of Iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Disease*, v. 83, n. 4, p. 345-350, 1999.

- QIU, W.; MOYER, J. W. Tomato Spotted Wilt Tospovirus Adapts to the TSWV N Gene-Derived Resistance by Genome Reassortment. *Phytopathology*, v. 89, n. 7, p. 575-582, 1999.
- RAI, M. Refinement of the *Citrus tristeza virus* resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Mol. Biol*, v. 61, p. 399-414, 2006.
- RATCLIFF, F. *et al.* Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, v. 25, p. 237-245, 2001.
- REBEAUD, F. *et al.* The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol*, v. 9, p. 272-281, 2008.
- REDDY, D. V. R. *et al.* Peanut bud necrosis virus disease: an overview. 1995. In: PAPPU, H. R.; JONES, R. A. C.; JAIN, R. K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems : Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, v. 141, p. 219-236, 2009.
- RESENDE, J. A. M. *et al.* Incidence, biological and serological characteristics of a tospovirus infecting experimental fields of zucchini in São Paulo State. *Tropical Plant Pathology antiga Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 92-95, 1997.
- RIBEIRO, D. Analysis of the intracellular behaviour of the viral structural proteins. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. 2007. 136 p.
- RIBEIRO, D. *et al.* Tomato spotted wilt virus glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. *J Gen Virol*, v. 89, n. 8, p. 1811-1818, 2008.
- RICHMOND, K. E. *et al.* Characterization of the nucleic acid binding properties of *Tomato spotted wilt virus* nucleocapsid protein. *Virology*, v. 248, n. 1, p. 6-11, 1998.
- ROGGERO, P. *et al.* Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Disease*, v. 86, p. 950-954, 2002.
- ROJO, E. *et al.* VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr Biol*, v. 14, p. 1897-1906, 2004.
- SAINSBURY, F.; LOMONOSSOFF, G. P. Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol*, v. 148, n. 3, p. 1212-1218, 2008.
- SAINSBURY, F. *et al.* pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J*, v. 7, n. 7, p. 682-693, 2009.
- SAMBROOK, J. *et al.* *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SAMUEL, G. *et al.* Investigation on “spotted wilt” of tomatoes. Commonwealth of Australia, *Council for Scientific and Industrial Research Bulletin*, v. 44, 64 p, 1930.

- SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. *Bunyaviridae: the viruses and their replication*. In: Fields Virology, 4th edition (D. M. Knipe and P. Howley). *Fundamental virology*. Philadelphia: Lipincott-Williams; Wilkins, p.1581-1602. 2001.
- SCHMALJOHN C. S, NICHOL ST. *Bunyaviridae*. In: Fields Virology, 5th v. 2. Edited by: Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott-Williams; Wilkins; p. 1741-1790. 2007
- SCHOLTHOF, H. B. *et al.* Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 34, p. 299-323, 1996
- SEEPIBAN, C. *et al.* *Tomato necrotic ringspot virus*, a new tospovirus isolated in Thailand. *Arch Virol*, v. 156, n. 2, p. 263-674, 2011.
- SHAPIRO, A. D.; ZHANG, C. The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in arabidopsis. *Plant Physiol*, v. 127, p. 1089-1101, 2001.
- SHARMA, K. K. *et al.* Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 41, p. 102-112, 2005.
- SHI, X. *et al.* Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol*, v. 80, n. 16, p. 8089-8099, 2006.
- SHIRASU, K. *et al.* Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*, v. 9, p. 261-270, 1997.
- SILBERSCHMIDT, K. M. A doença vira-cabeça do tomateiro. *O Biológico*, v.3, p.183-184, 1937.
- SILVA, M. S. *et al.* Sequence diversity of NSm movement protein of tospoviruses. *Arch Virol*, v. 146, n. 7, p. 1267-1281, 2001.
- SIN, S. H. *et al.* Viral genetic determinants for thrips transmission of *Tomato spotted wilt virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 14, p. 5168-5173, 2005.
- SINGH, A. B.; SRIVATAVA, S. K. Status and control strategy of Peanut bud necrosis disease in Uttar Pradesh. 1995. In: PAPPU, H. R.; JONES, R. A. C.; JAIN, R. K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, v. 141, p. 219-236, 2009.
- SIVPARSAD, B.; GUBBA, A. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolates occurring in the Republic of South Africa (RSA). *African Journal of Agricultural Research*, v. 6 (3), p. 3013-3020, 2011.
- SMITH, K. M. Studies on plant virus diseases. XI. Further experiments with a ringspot virus: its identification with spotted wilt of tomato. *Ann. Appl. Biol*, v.19, p.305-320, 1932. In: PADGETT, H. S.; BEACHY, R. N. Analysis of a *Tobacco mosaic virus* strain capable of overcoming N gene-mediated resistance. *Plant Cell*, v. 5, p. 577-586, 1993.

- SNIPPE, M. *Tomato spotted wilt virus particle assembly*. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. 2006. 128p.
- SOOSAAR, J. L. M. *et al.* Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature*, v. 3, p. 789-798, 2005.
- SPASSOVA, M. *et al.* 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.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol*, v. 5, p. 233-241, 1996.
- STEVENS, J. R. *et al.* Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, v. 59, p. 9-17, 1992.
- STEVENS, M. R. *et al.* Mapping the *Sw-5* locus for *Tomato spotted wilt virus* resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theor Appl Gen*, v. 90, p. 451-456, 1995.
- STORMS, M. M. *et al.* The nonstructural NSm protein of *tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*, v. 214, n. 2, p. 485-493, 1995.
- STORMS, M. R. Circumcision and endocarditis prophylaxis. *Arch Pediatr Adolesc Med*, v. 152, n. 10, p. 1038-1039, 1998.
- TAKAHASHI, H. *et al.* Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in Cucumber mosaic virus-Infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. v. 42, p. 340-347, 2001.
- TAKEDA, A. *et al.* Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett*, v. 532, n. 1-2, p. 75-79, 2002.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p.2731-2739, 2011.
- TENTCHEV, D. *et al.* Evolution and structure of *Tomato spotted wilt virus* populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology*, v. 92, p. 961-973, 2011.
- THOMAS-CARROL, M.L.; JONES, R.A.C. Selection, biological properties and fitness of resistance-breaking strains of *Tomato spotted wilt virus* in pepper. *Ann. Appl. Biol.* v. 142, p. 235-243, 2003.
- THOMENIUS, M.; KORNBLUTH, S. Multifunctional reaper: sixty-five amino acids of fury. *Cell Death Different*. v. 13, p. 1305-1309, 2006.
- THOMPSON, G. J.; VAN ZIJL, J. J. B. Control of *Tomato spotted wilt virus* in tomatoes in South Africa. *Acta Hort*, v. 431, p. 379-384, 1996.

- THOMPSON, J. D. *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TOMITA, R. *et al.* Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene *L3* of *Capsicum chinense* in a 400-Kb region of *R*-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences. *Theor. Appl. Genet*, v. 117, n. 7, p. 1107-1118, 2008.
- TSOMPANA, M. *et al.* The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 53-66, 2005.
- ULLMAN, D. E. *et al.* A midgut barrier to *Tomato spotted wilt virus* acquisition by adult western flower thrips. *Phytopathology*, v. 82, p. 1333-1342, 1992a.
- ULLMAN, D. E. *et al.* Thrips-tomato spotted wilt virus interaction: Morphological, behavioral and cellular components influencing thrips transmission. *Advances in Disease Vector Research*, v. 9, p. 195-240, 1992b.
- ULLMAN, D. E. *et al.* Tospovirus replication in insect vector cells. Immunochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S-RNA of Tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology*, v.83, p. 456-463, 1993.
- ULLMAN, D. E. *et al.* Thrips and tospovirus come of age: mapping determinants of insect transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 14, p. 4931-4932, 2005.
- UREN, A. G. *et al.* Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*, v. 6, p. 961-967, 2000.
- VALLEJOS, C. E. *et al.* Genetic and molecular characterization of the *I* locus of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, v. 172, p. 1229-1242, 2006.
- VAN BAARLEN, P. *et al.* Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of Arabidopsis with three Botrytis species: an important role for cell death control. *Mol Plant Pathol*, v. 8, p. 41-54, 2007.
- VANCE, R. E. *et al.* Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*, v. 6, p. 10-21, 2009.
- VAN DER BIEZEN, E. A.; JONES, J. D. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol*, v. 8, n. 7, p. 226-227, 1998.
- VAN DOORN, W. G. Gene expression during anthesis and senescence in Iris flowers. *Plant Molecular Biology*, v. 53, p. 845-863, 2003.
- VAN DOORN, W. G.; WOLTERING, E. J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, v. 10, p. 117-122, 2005.

- VAN DOORN, W. G. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of Experimental Botany Advance*, doi:10.1093/jxb/err196, 2011
- VAN DOORN, W. G. *et al.* Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* doi:10.1038/cdd.2011.36, 2011.
- VAN KAN, J. A. L. *et al.* Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, v. 11, p. 247-253, 2006.
- VAN POELWIJK, F. *et al.* Sequence analysis of the 5' ends of *Tomato spotted wilt virus* N mRNAs. *Arch Virol*, v. 141, n. 1, p. 177-84, 1996.
- VAN REGENMORTEL, M. H. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology*, v. 31, n. 5, p. 241-54, 1990.
- VAN ZIJL, J. J. B. *et al.* Breeding tomatoes for processing in South Africa. *Acta Hortic.*, v. 194, p. 69-75, 1986.
- VIDAL, S. *et al.* Potato gene Y-1 is an N gene homolog that confers cell death upon infection with *Potato virus Y*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, v. 15, p. 717-727, 2002.
- WALTON, J.D. Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell*, v. 8, p. 1723-1733, 1996.
- WEBER, H., *et al.* Two amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-2(2) resistance gene in the tomato. *J. Virol.* 67:6432-6438, 1993.
- WEBSTER, C. G. *et al.* A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology*, v. 413, p. 216-225, 2011.
- WHITFIELD, A. E. *et al.* *Tomato spotted wilt virus* glycoprotein G(C) is cleaved at acidic pH. *Virus Res*, v. 110, n. 1-2, p. 183-186, 2005.
- WHITFIELD, A. *et al.* A soluble form of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) Glycoprotein G_N (G_N-S) inhibits transmission of TSWV by *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*, v. 98, p. 45-50, 2008.
- WHITHAM, S. *et al.* The product of the *Tobacco mosaic virus* resistance gene *N*: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, v. 78, p. 1101-1115, 1994.
- WIERMER, M. *et al.* Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol*, v. 8, p. 383-389, 2005.
- WIJKAMP, I. *et al.* Multiplication of *Tomato spotted wilt virus* in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 341-349, 1993.
- WIJKAMP, I. *et al.* Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology*, v. 85, p. 1069-1074, 1995.

- WILLIAMS, L. V. *et al.* Occurrence and geographical distribution of tospovirus species infecting tomato crops in Argentina. *Plant Dis*, v.85, p. 1227-1229, 2001.
- WOLF, B. B.; GREEN, D.R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 20049-20052, 1999.
- WON, S. *et al.* NSm protein of *Rift Valley fever virus* suppresses virus-induced apoptosis. *J Virol*, v. 81, n. 24, p. 13335-13345, 2007.
- WROBLEWSKI, T. *et al.* Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, v. 3, p. 259-273, 2005.
- YANG, Z. N. *et al.* Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the *Citrus tristeza virus* resistance gene (*Ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* L. Raf. *Plant Physiol*, v. 131, p. 482-492, 2003.
- YOSHIKAWA, N. *et al.* A movement protein and three capsid proteins are all necessary for the cell-to-cell movement of *Apple latent spherical cheravirus*. *Arch Virol*, v. 151, p. 837-848, 2006.
- ZACCARDELLI, M. *et al.* Tomato genotypes resistant to *Tomato spotted wilt virus* evaluated in open field crops in southern Italy. *Acta Hort*, v. 789, p. 147-150, 2008.
- ZHANG, Y. *et al.* The nucleocapsid protein of an enveloped plant virus, Tomato spotted wilt virus, facilitates long-distance movement of *Tobacco mosaic virus* hybrids. *Virus Research*. doi: 10.1016/j.virusres.2001.10.006, 2011.
- ZHOU, J. *et al.* Molecular characterization of a new tospovirus infecting soybean. *Virus Genes*, v. 43, n. 2, p. 289-295, 2011.
- ZIMMERMANN, P. *et al.* GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, v. 136, p. 2621-2632, 2004.