

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DAS GLICOPROTEÍNAS DE  
TOSPOVÍRUS COM OCORRÊNCIA NO BRASIL  
E ESTUDO DA REAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE  
*Capsicum chinense* A  
*Tomato spotted wilt virus***

**DOUTORANDA: FERNANDA ANTINOLFI LOVATO**  
**ORIENTADOR: Dr. ANTÔNIO CARLOS DE ÁVILA**  
**CO-ORIENTADORA: Drª ALICE KAZUKO INOUE NAGATA**

**BRASÍLIA, 2004**

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DAS GLICOPROTEÍNAS DE  
TOSPOVÍRUS COM OCORRÊNCIA NO BRASIL  
E ESTUDO DA REAÇÃO DE RESISTÊNCIA DE**  
*Capsicum chinense A*  
*Tomato spotted wilt virus*

**Doutoranda: Fernanda Antinolfi Lovato**  
**Orientador: Dr. Antônio Carlos de Ávila**  
**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> 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, 2004**

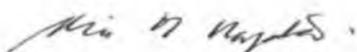
Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do pesquisador Dr. Antônio Carlos de Ávila, e apoio institucional e financeiro da Capes.

**Aprovado por:**



**Dr. Antônio Carlos de Ávila (orientador)**

Pesquisador da Embrapa Hortaliças.



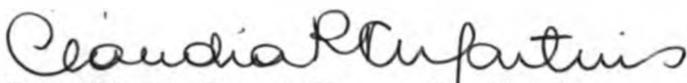
**Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata (co-orientadora)**

Pesquisadora da Embrapa Hortaliças.



**Dr. Bergmann Morais Ribeiro**

Professor do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.



**Dra. Cláudia Renata Fernandes Martins**

**(Suplente do Dr. Renato de Oliveira Resende)**

Professores do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.



**Dr. Tatsuya Nagata**

Professor da Universidade Católica de Brasília

***Agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pela força espiritual indispensável para a conclusão deste trabalho.***

***Dedico à minha filha Maria Luiza, ao meu marido Luiz Alberto e aos meus pais Luiz Alberto e Luiza Aurora, que sempre me ajudaram e incentivaram a prosseguir pelo fascinante caminho da pesquisa.***

**“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 as 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, Bíblia Sagrada)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador Dr. Antônio Carlos de Ávila e à minha co-orientadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata, pelos ensinamentos, orientação, exemplo, amizade e incentivo proporcionados durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Tatsuya Nagata, pelas idéias, sugestões, auxílio e amizade.

Ao Dr. Renato de Oliveira Resende, pela oportunidade de desenvolver esta tese, amizade e incentivo.

Ao Dr. Bergmann Morais Ribeiro, pela disposição e auxílio na condução do trabalho.

Ao Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pelo exemplo e por ter me concedido uma oportunidade no início da minha carreira científica.

Aos pesquisadores Dr. André Nepomuceno Dusi, Dr. Antônio Carlos Torres e Dra. Isabel Cristina Bezerra, pelos ensinamentos e incentivo.

Ao Dr. Leonardo Boiteux e à Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca, pelo auxílio na condução de experimentos.

Aos meus amigos da Embrapa Hortaliças, Élcio Vieira Lopes e Lúcio Flávio Barbosa, pela ajuda nos experimentos, aprendizagem, incentivo e amizade, fundamentais para a condução da tese.

Aos amigos Anelise Franco Orílio, Cristiane Lopes de Oliveira, Danielle Nunes Borges, Fernanda Rausch Fernandes Carrijo, Gleydson Barros Ferreira, Hamilton Lourenço, Leonardo Cunha de Albuquerque, Leonardo Nunes da Fonseca, Luís Cláudio Vieira da Cunha, Wesley Braga da Rocha, pela amizade, apoio e momentos agradáveis de convívio.

Aos funcionários da Embrapa Hortaliças, pelo suporte técnico concedido.

Aos professores e colegas do curso de pós-graduação em Biologia Molecular, pelos ensinamentos científicos.

À Capes, pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao CNPq/CBAB, pelo auxílio financeiro concedido.

À Embrapa Hortaliças por oferecer a infra-estrutura necessária para a execução dos experimentos.

À Universidade de Brasília, por permitir minha participação no curso de doutorado em Biologia Molecular.

À minha filha Maria Luiza e ao meu marido Luiz Alberto, pelo amor incondicional, carinho, compreensão, confiança e suporte financeiro prestados.

Aos meus pais Luiz Alberto e Luiza Aurora, pelo amor, carinho, dedicação, paciência e compreensão sempre proporcionados a mim.

A Deus e à Nossa Senhora, pela força espiritual e graças alcançadas.

# ÍNDICE

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Capítulo 1 - Revisão bibliográfica</b>	
1. A família <i>Bunyaviridae</i> .....	<b>9</b>
2. O gênero <i>Tospovirus</i> .....	<b>9</b>
2.1. História e classificação dos tospovírus.....	<b>9</b>
2.2. Ocorrência dos tospovírus no mundo.....	<b>13</b>
2.3. Ocorrência dos tospovírus no Brasil .....	<b>14</b>
2.4. Sintomatologia.....	<b>15</b>
2.4.1. Tospovírus em <i>Capsicum</i> spp.....	<b>16</b>
3. Morfologia e organização genômica dos tospovírus.....	<b>17</b>
4. Ciclo de infecção dos tospovírus na planta.....	<b>21</b>
5. Transmissão e ciclo de infecção dos tospovírus no inseto vetor.....	<b>24</b>
6. Interações celulares entre tripes e tospovírus.....	<b>26</b>
7. Replicação do TSWV em células de inseto.....	<b>27</b>
8. Glicoproteínas do gênero <i>Bunyavirus</i> .....	<b>29</b>
9. Glicoproteínas do gênero <i>Tospovirus</i> .....	<b>31</b>
10. Controle dos tospovírus.....	<b>33</b>
11. Formas <u>defectivas</u> de tospovírus.....	<b>37</b>
12. Mecanismos de defesa da planta contra o ataque de patógenos.....	<b>39</b>
12.1. Reação de hipersensibilidade (RH).....	<b>40</b>
12.2. Morte celular programada.....	<b>41</b>
12.3. Teoria Gene-a-Gene.....	<b>43</b>
13. Vetores de expressão de genes em plantas.....	<b>45</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>48</b>
<b>Capítulo 2 – Análise da seqüência das glicoproteínas de <i>Tomato chlorotic spot virus</i> e <i>Groundnut ringspot virus</i> e comparação com outros tospovírus</b> .....	<b>49</b>
<b>Capítulo 3 – O gene do <i>Tomato spotted wilt virus</i> elicitor da reação de hipersensibilidade em <i>Capsicum chinense</i></b> .....	<b>68</b>

<b>Análises conclusivas.....</b>	<b>89</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>93</b>

**ÍNDICE**  
**FIGURAS E TABELAS**

**Capítulo 1**

Tabela 1.....	12
Figura 1.....	20
Figura 2.....	23

**Capítulo 2**

Tabela 1.....	62
Tabela 2.....	63
Tabela 3.....	64
Figura 1.....	65
Figura 2.....	66
Figura 3.....	67

**Capítulo 3**

Tabela 1.....	82
Tabela 2.....	82
Tabela 3.....	83
Figura 1.....	84
Figura 2.....	84
Figura 3.....	85
Figura 4.....	85
Figura 5.....	86
Figura 6.....	86
Figura 7.....	87
Figura 8.....	87
Figura 9.....	88
Figura 10 .....	88

## INTRODUÇÃO

Os tospovírus são conhecidos desde o início do século passado representados pelo vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). A doença causada por esse vírus foi inicialmente descrita na Austrália (Brittlebank, 1919) e logo foi reportada no mundo inteiro, provavelmente disseminada pelo inseto vetor tripses (ordem Thripidae), predominantemente pela espécie *Frankliniella occidentalis*. No Brasil, a doença foi primeiramente relatada por Silberschmidt (1937), permanecendo vulgarmente conhecida como vira-cabeça do tomateiro, devido aos sintomas que o vírus provoca no tomate.

Atualmente, o TSWV é a espécie-tipo do gênero *Tospovirus*, que representa o único membro da família *Bunyaviridae* que infecta plantas. O TSWV infecta mais de mil espécies de plantas e causa severos prejuízos econômicos pelo mundo principalmente em culturas como: alface, amendoim, batata, ervilha, fumo, pimenta, pimentão, tomate e muitas espécies ornamentais (<http://www.oznet.ksu.edu/tospovirus/hostlist.html>).

Os vírus que constituem a família *Bunyaviridae* compartilham entre si um grande número de características morfológicas, bioquímicas e moleculares. Suas partículas são quase isométricas e são formadas por nucleocapsídeos, onde estão inseridos os genomas encapsidados pela nucleoproteína. As glicoproteínas estão presentes na superfície da partícula viral, inseridas no envelope lipídico na forma de projeções, circundando os nucleocapsídeos (Mohamed *et al.*, 1973; Tas *et al.*, 1977). O genoma dos tospovírus é constituído por três segmentos de RNA fita simples denominados "large RNA" (L), "medium RNA" (M) e "small RNA" (S) (van den Hurk *et al.*, 1977; Verkleij *et al.*, 1982). O S RNA e o M RNA possuem estratégia de codificação ambisenso, enquanto o L RNA sintetiza um único mRNA, que codifica a polimerase viral (de Haan *et al.*, 1991; van Poelwijk *et al.*, 1993; Adkins *et al.*, 1995). As glicoproteínas G1 e G2 são codificadas a partir de um gene precursor expresso pelo M RNA no sentido viral complementar (Kormelink *et al.*, 1992a).

As glicoproteínas virais desempenham papel importante durante vários estádios do ciclo de replicação dos vírus. Elas se ligam às proteínas que interagem com receptores presentes na superfície das células de vertebrados

suscetíveis e células de insetos vetores e influenciam a transmissão do vírus pelo inseto vetor. Além disso, essas proteínas formam a interface entre a partícula viral, o hospedeiro e o inseto vetor e regulam o processo de morfogênese da partícula viral dentro da célula hospedeira (Kikkert, 1999; Medeiros *et al.*, 2004).

A função das glicoproteínas na espécie-tipo do gênero *Tospovirus*, TSWV, ainda é pouco conhecida. Porém, o fato do TSWV se replicar tanto na planta quanto no inseto vetor sugere que o funcionamento das glicoproteínas esteja relacionado com esse duplo tropismo. Em analogia a outros vírus envelopados (Beaty *et al.*, 1982; Gonzales-Scarano, 1985; Ludwig *et al.*, 1989 e 1991), as glicoproteínas dos tospovírus parecem estar envolvidas na ligação do vírus com o tecido intestinal do vetor tripes e em sua posterior replicação e transporte pelo corpo do inseto (Kormelink *et al.*, 1992a; Ullman *et al.*, 1995; Bandla *et al.*, 1998). Quando o ciclo do tripes é interrompido e o vírus é transmitido mecanicamente diversas vezes para as plantas, o TSWV tende a perder a habilidade de expressar as glicoproteínas, e conseqüentemente, a capacidade de formar partículas envelopadas (Ie, 1982; Verkleij & Peters, 1983; Resende *et al.*, 1991b). Em experimentos de transmissão, os vírus mutantes deficientes em envelope não foram transmitidos por tripes, apesar de terem sido transmitidos mecanicamente e causarem infecção sistêmica nas plantas (Wijkamp, 1995), sugerindo que as glicoproteínas não desempenham função crucial na ligação do vírus às células em infecções de plantas (Resende *et al.*, 1991b).

Até o momento, das 13 espécies de tospovírus reconhecidas pelo Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus (ICTV) (van Regenmortel *et al.*, 2000), foi determinada a seqüência de nucleotídeos dos genes precursores codificadores das glicoproteínas para somente cinco: TSWV, *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Peanut bud necrosis virus* (PBNV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV). A seqüência do precursor das glicoproteínas de uma espécie tentativa denominada *Gloxinia tospovirus* também está disponível.

Os avanços na determinação da seqüência nucleotídica do genoma dos tospovírus ocorreram paralelamente aos estudos da interação vírus-hospedeiro

e, em particular, as respostas do tipo resistência a determinadas espécies virais.

Ao longo das últimas décadas, genes naturais de resistência de plantas à infecção provocada por tospovírus têm sido identificados e caracterizados com frequência. Em plantas do gênero *Capsicum*, foi identificado o gene de resistência *Tsw*, efetivo contra isolados da espécie TSWV, especialmente nos acessos de *Capsicum chinense* 'PI 159236' e 'PI 152225' (Black *et al.*, 1991). A reação desta planta em resposta à inoculação mecânica do TSWV é típica de hipersensibilidade, sendo o gene de dominância simples e bastante estável (Boiteux, 1995; Black *et al.*, 1996). Entretanto, isolados de outras espécies de *Tospovirus*, como *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV), causam infecção sistêmica na planta (Boiteux & de Ávila, 1994)./

O presente trabalho foi desenvolvido seguindo duas linhas de pesquisa essenciais ao entendimento do processo de infecção por tospovírus. O primeiro tema está relacionado com a determinação da seqüência de nucleotídeos da região 3' do M RNA de duas das principais espécies de tospovírus com ocorrência no Brasil. O segundo tema é concentrado no estudo da interação entre TSWV e *Capsicum chinense* resistente à infecção sistêmica deste vírus.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão sobre os tospovírus e mecanismos de defesa da planta contra o ataque de patógenos, abordando temas diretamente relacionados com esta tese.

Na primeira parte do trabalho, descrita no Capítulo 2, foram determinadas as seqüências de nucleotídeos completas da região intergênica do M RNA, da região 3' terminal não traduzível do M RNA e dos genes precursores das glicoproteínas G1 e G2 das espécies de tospovírus TCSV e GRSV. Posteriormente, foram construídas árvores filogenéticas dos tospovírus, baseando-se no alinhamento das seqüências das regiões intergênicas do M RNA e das glicoproteínas das espécies de tospovírus conhecidas. Os resultados obtidos neste estudo representam uma etapa inicial e indispensável para o estudo da interação de proteínas receptoras do vetor com as proteínas de superfície G1 e G2 dos tospovírus.

Na segunda parte deste trabalho, descrita no Capítulo 3, foi identificado o provável gene de avirulência do TSWV que interage com o gene de resistência *Tsw* em *Capsicum chinense* 'PI159236', utilizando como ferramenta o vetor de expressão binário baseado em *Potato virus X* (PVX) e *Agrobacterium tumefaciens* (pGR107) pelo método da agro-inoculação.

## RESUMO

A espécie-tipo do gênero *Tospovirus*, o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), causa uma séria doença em centenas de espécies de plantas, sendo disseminada pelo mundo através do inseto vetor tripses. No Brasil, os tospovírus TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) são responsáveis por elevados danos econômicos em importantes culturas, incluindo alface, amendoim, fumo, pimenta, pimentão e tomate. O genoma dos tospovírus é constituído por três segmentos de RNA fita simples (denominados S, M e L RNA), codificando três proteínas estruturais (L, G1 e G2) e duas proteínas não-estruturais (NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub>). As glicoproteínas G1 e G2 são projetadas a partir do envelope lipídico e possivelmente apresentam função importante durante a entrada do vírus nas células do vetor e, conseqüentemente, na transmissão viral. Esta tese descreve a análise do precursor das glicoproteínas e das regiões intergênica e 3' terminal do M RNA do TCSV e do GRSV, baseando-se na determinação e comparação das seqüências dos aminoácidos e nucleotídeos dessas duas espécies com as de outros tospovírus. Os resultados das comparações indicaram que a seqüência de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas do TCSV apresentou 81% de identidade com o TSWV, enquanto o GRSV apresentou 79% com o TSWV. Ao serem comparadas as seqüências de aminoácidos dos precursores do TCSV e GRSV entre si, a identidade aumentou para 92%, indicando que essas duas espécies mostraram alta similaridade e diferiram das demais espécies de tospovírus. Entretanto, o resultado da comparação das seqüências de nucleotídeos da região intergênica do M RNA do TCSV e GRSV mostrou ser de apenas 78% de identidade. As análises filogenéticas, baseadas nas seqüências do precursor das glicoproteínas e da região intergênica do M RNA, revelaram que TCSV e GRSV formaram um só agrupamento, próximo ao TSWV e distante das demais espécies de tospovírus. Os parâmetros taxonômicos relacionados à delimitação das espécies de tospovírus foram ainda discutidos.

Na última década, foi relatada a reação de resistência tipo hipersensibilidade (HR) em acessos de *Capsicum chinense* 'PI152225' e 'PI159236' inoculados mecanicamente com TSWV. A segunda parte da tese descreve a identificação do provável gene de avirulência elicitor da reação de HR em *C. chinense* 'PI159236', conforme a teoria gene-a-gene de Flor (1942). Com este intuito, os genes das proteínas N (nucleoproteína), NS<sub>M</sub> (proteína de movimento) e NS<sub>S</sub> foram clonados individualmente no vetor binário pgR107 (pPVX), baseado no sistema de expressão *Potato virus X* (PVX). Os clones de *Agrobacterium tumefaciens* recombinantes transformados com as construções PVX+N, PVX+NS<sub>M</sub>, PVX+NS<sub>S</sub>, assim como o controle (*A. tumefaciens* transformada com pPVX), foram inoculadas com palito em *C. chinense* 'PI159236', *Datura stramonium* e *Nicotiana benthamiana*. Os sintomas de PVX (clareamento de nervura, clorose internerval e mosqueado) apareceram na maioria das plantas inoculadas com as construções PVX+N, PVX+NS<sub>M</sub> e PVX+NS<sub>S</sub>. ELISA e "western blotting" foram realizados com as plantas sintomáticas e confirmaram a expressão das proteínas N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub>. As plantas de *C. chinense* 'PI159236', *Datura stramonium* e *Nicotiana benthamiana* inoculadas com a construção PVX+NS<sub>S</sub> mostraram expressão de sintomas necróticos sistêmicos severos, provavelmente causados pelo sinergismo do PVX com a proteína NS<sub>S</sub>. As plantas inoculadas com a construção PVX+NS<sub>M</sub> mostraram sintomas idênticos à infecção ocasionada por pPVX, sugerindo que a proteína NS<sub>M</sub> não interferiu na expressão dos sintomas do PVX. Lesões cloróticas e necróticas tipo - HR acompanhadas por abscisão foliar foram observadas somente em *C. chinense* 'PI159236' inoculadas com a construção PVX+N, diferindo significativamente dos sintomas causados pelo pPVX e PVX selvagem. Esses resultados indicaram que o gene N provavelmente é o gene de avirulência elicitor da reação tipo - HR em *C. chinense* 'PI159236'.

## ABSTRACT

The *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is the type-species of the genus *Tospovirus*. This species is spread worldwide and today causes a serious disease on hundreds of plant species. In Brazil, the tospoviruses TSWV, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) and *Groundnut ringspot virus* (GRSV) are responsible for high economic losses in important crops as tomato, sweet pepper, pepper, lettuce, tobacco and peanut. The genome of tospoviruses is composed by three ssRNA (denoted S, M and L RNA), encoding three structural proteins (L, G1/G2 and N) and two non-structural proteins (NS<sub>M</sub> and NS<sub>S</sub>). The glycoproteins G1 and G2 are projected in the lipid envelope and most possibly play initial roles in virus entry in vector cells and consequent virus transmission. This thesis describes the analysis of the glycoprotein precursor and of the M RNA intergenic region (IGR) and 3' terminal region of TCSV and GRSV. This analysis is based on the determination and comparison of amino acid and nucleotide sequences of these two species with other tospoviruses. TCSV glycoprotein amino acid sequence showed 81% identity with that of TSWV, while GRSV showed 79% with TSWV. When TCSV and GRSV was compared, the identity percentage was 92%, indicating that these two viruses showed high similarity between them and differed from other tospoviruses. However, the comparison of M RNA IGR nucleotide sequence between TCSV and GRSV showed 78%. Phylogenetic analysis, based on sequences of glycoprotein precursor and M RNA IGR, revealed that TCSV and GRSV were clustered, close to TSWV and distinct from other tospoviruses. Taxonomic parameters related to delimitation of tospovirus species were also discussed.

In the past decade it was reported that reaction to TSWV mechanical inoculation in accessions of *Capsicum chinense* 'PI152225' and 'PI159236' resembled the hypersensitive-type response (HR). The second part of the thesis describes the attempts to identify the TSWV putative elicitor gene related to the HR-type reaction in *C. chinense* 'PI159236', according to gene-to-gene model of Flor (1942). For this purpose, the N (nucleoprotein), NS<sub>M</sub> (movement protein) and NS<sub>S</sub> genes of TSWV were cloned individually in frame into the

binary vector pgR107 (pPVX), based on *Potato virus X* (PVX) expression system. Recombinant *Agrobacterium tumefaciens* clones transformed with PVX+N, PVX+NS<sub>M</sub> and PVX+NS<sub>S</sub> constructs, as well as control (*A. tumefaciens* transformed with pPVX), were tooth-pick inoculated into *C. chinense* 'PI159236', *Datura stramonium* and *Nicotiana benthamiana* plants. Symptoms of PVX (vein clearing, interveinal chlorosis and mottling) appeared in the inoculated plants with the constructions PVX+N, PVX+NS<sub>M</sub>, PVX+NS<sub>S</sub> and pPVX. ELISA and western blotting were carried out with symptomatic plants and confirmed the N, NS<sub>M</sub> and NS<sub>S</sub> protein expression. *C. chinense*, *D. stramonium* and *N. benthamiana* inoculated with the construction PVX+NS<sub>S</sub> showed severe systemic necrotic symptoms expression, possibly caused by a synergism of PVX with NS<sub>S</sub> protein. These plants inoculated with PVX+NS<sub>M</sub> showed identical symptoms of PVX infection, suggesting that NS<sub>M</sub> protein did not interfere with PVX induced symptoms. HR-like chlorotic and necrotic lesions following leaf abscission were seen only in *C. chinense* 'PI159236' inoculated with the construct PVX+N gene, which differed significantly with symptoms caused by pPVX. This result indicated that the N gene is possibly the elicitor of the HR-like reaction in *C. chinense* 'PI159236'.

# CAPÍTULO 1

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. A família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* é composta predominantemente por vírus que infectam roedores e outros pequenos mamíferos, primatas e pássaros, e em sua maioria são arbovírus, transmitidos por mosquitos, moscas ou carrapatos. Em 1943, foi identificado o *Bunyamwera* virus, um dos primeiros vírus da família isolado do mosquito vetor *Aedes*, causando uma doença severa no homem (Smithburn *et al.*, 1946). Muitos outros vírus relacionados sorologicamente com este foram surgindo ao longo das décadas seguintes e foram classificados por Casals (1963) como parte do supergrupo *Bunyamwera*. Após a identificação da maioria dos vírus existentes em relação ao tamanho, morfologia e aspectos bioquímicos e genéticos, o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus (ICTV) reconheceu a nova família de vírus *Bunyaviridae* (Bishop *et al.*, 1980). Posteriormente, o Supergrupo *Bunyamwera* tornou-se o gênero *Bunyavirus* e foram criados os gêneros *Phlebovirus*, *Uukuvirus*, *Nairovirus*, *Hantavirus* e *Tospovirus* (Francki *et al.*, 1991). No último relatório do ICTV, a família *Bunyaviridae* é composta pelos gêneros *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* (van Regenmortel *et al.*, 2000).

### 2. O gênero *Tospovirus*

#### 2.1. História e classificação dos tospovírus

Em 1915, ocorreu na Austrália o primeiro relato da doença denominada “spotted wilt” infectando tomate (Brittlebank, 1919). Em 1927, foi demonstrado que a doença era transmitida pelo inseto tripses (Pittman, 1927). Quinze anos após o primeiro relato, Samuel *et al.* (1930) diagnosticaram o agente etiológico da doença como sendo o vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ou vírus do bronzeamento do tomateiro. Durante a década de 40, o vírus apresentou uma

incidência esporádica e tornou-se pouco importante (Best, 1968). Na década de 80, o vírus tornou-se um sério problema econômico para a agricultura, intensificando-se assim a realização de estudos sobre sua biologia molecular. Em vários países da Europa surgiram referências ao vírus causando prejuízos econômicos em hortaliças e algumas espécies de ornamentais (Gebre-Sellassie *et al.*, 1989; Marchoux *et al.*, 1991; Vaira *et al.*, 1993; Jorda *et al.*, 1995). Os estudos realizados com esse vírus mostraram que ele apresentava características diferentes dos outros vírus de planta caracterizados até o momento, tais como: tamanho da partícula, forma, constituição e organização genômica (van Kammen *et al.*, 1966; Milne, 1970; Mohamed *et al.*, 1973; Tas *et al.*, 1977; de Haan *et al.*, 1990). Durante cerca de seis décadas, o vírus foi o único membro do grupo de vírus de planta chamado *Tomato spotted wilt virus group* (Matthews, 1979). A análise molecular do genoma do TSWV mostrou que esse vírus apresentava características semelhantes aos vírus da família *Bunyaviridae*, composta por vírus de RNA negativo que infectam animais. Assim, TSWV foi reclassificado como o protótipo de um novo gênero de vírus de planta, denominado *Tospovirus* (Francki *et al.*, 1991). Com isso, *Tospovirus* passou a ser o único gênero da família *Bunyaviridae* que infecta plantas. Gradualmente, foram sendo identificados vírus que infectavam plantas, semelhantes ao TSWV, mas com características sorológicas e seqüências genômicas diferentes do TSWV. O primeiro deles foi o *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (Law & Moyer, 1990; de Ávila, 1992).

O conceito de espécie na taxonomia dos vírus, aceito pelo ICTV, foi definido por van Regenmortel (1990). Até então, a classificação dos vírus pertencentes aos diferentes gêneros da família *Bunyaviridae* era baseada em sorologia. No início dos anos 90, foram estabelecidos diferentes sorotipos de tospovírus com base na relação sorológica que apresentavam entre si (de Ávila *et al.*, 1990; Adam *et al.*, 1993). Em [1993], de Ávila *et al.* sugeriram que o critério de diferenciação de espécies de tospovírus deveria ser baseado principalmente na divergência da seqüência de aminoácidos da proteína do nucleocapsídeo (N). Os resultados obtidos neste trabalho concluíram que os isolados BR-03 e SA-05, pertencentes ao sorogrupo II, deveriam ser considerados como espécies distintas dentro do gênero *Tospovirus*, sendo proposto os nomes *Tomato chlorotic spot virus* e *Groundnut ringspot virus*,

respectivamente. Durante a última reunião sobre tospovírus, ocorrida em Wageningen (1998), os tospovirologistas concordaram em estabelecer treze diferentes espécies de tospovírus. A classificação atual de tospovírus em nível de gênero é baseada na morfologia do vírion, na organização do genoma e na transmissão por tripes, enquanto os parâmetros para a classificação em nível de espécie são baseados em características biológicas, como círculo de hospedeiros (amplo e restrito) e espécies de tripes vetor, e moleculares, como grau de similaridade da sequência de aminoácidos da proteína do nucleocapsídeo. Para definir uma nova espécie, a identidade de aminoácidos da proteína N, ao ser comparada à proteína N de outras espécies já descritas, deve ser inferior a 90% (Goldbach & Kuo, 1996). As treze espécies (Tabela 1) confirmadas pelo ICTV até o momento são: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Groundnut yellow spot virus* (GYSV), *Groundnut chlorotic fan-spot virus* (GCFSV), *Physalis severe mottle virus* (PhySMV) e *Watermelon bud necrosis virus* (WBNV) (van Regenmortel *et al.*, 2000). A tabela 1 apresenta a lista das treze espécies com os respectivos hospedeiros relatados, vetor e distribuição geográfica.

**Tabela 1.** Espécies de tospovírus, hospedeiros, espécies de tripes vetores e distribuição geográfica.

<b>Espécie de tospovírus</b>	<b>Principais hospedeiros</b>	<b>Vetor</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Monocotiledôneas, dicotiledôneas, incluindo hortaliças e ornamentais	<i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i> <i>F. fusca</i> <i>F. intonsa</i> <i>F. bispinosa</i> <i>T. palmi</i> <i>T. setosus</i> <i>T. tabaci</i>	Cinco continentes
<i>Impatiens necrotic spot virus</i> (INSV)	Ornamentais e hortaliças	<i>F. occidentalis</i>	EUA, Europa e Israel
<i>Tomato chlorotic spot virus</i> (TCSV)	Tomate	<i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i> <i>F. intonsa</i>	Brasil
<i>Groundnut ringspot virus</i> (GRSV)	Tomate e amendoim	<i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i>	Argentina, Brasil e África do Sul
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> (CSNV)	Crisântemo e tomate	<i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i>	Brasil
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> (ZLCV)	Cucurbitáceas	<i>F. zucchini</i>	Brasil
<i>Iris yellow spot virus</i> (IYSV)	Cebola, alho e iris	<i>T. tabaci</i>	EUA, Brasil, Holanda e Israel
<i>Groundnut bud necrosis virus</i> (GBNV)	Amendoim	<i>T. palmi</i>	Índia
<i>Watermelon silver mottle virus</i> (WSMoV)	Cucurbitáceas	<i>T. palmi</i>	Japão e Taiwan
<i>Watermelon bud necrosis virus</i> (WBNV)	Cucurbitáceas	<i>T. flavus</i>	Índia
<i>Groundnut yellow spot virus</i> (GYSV)	Amendoim	<i>S. dorsalis</i>	Índia
<i>Groundnut chlorotic fan-spot virus</i> (GCFSV)	Amendoim	<i>S. dorsalis</i>	Taiwan
<i>Physalis severe mottle virus</i> (PhySMV)	<i>Physalis minima</i> , cucurbitáceas	<i>T. palmi</i>	Japão e Tailândia

Fonte: Cortez (1999) e [http://www.oznet.ksu.edu/tospovirus/tospo\\_list.htm](http://www.oznet.ksu.edu/tospovirus/tospo_list.htm).

## 2.2. Ocorrência dos tospovírus no mundo

A ocorrência do TSWV já foi relatada nos cinco continentes (Goldbach & Peters, 1994), enquanto as espécies GBNV e WSMoV só foram diagnosticados nos respectivos centros de origem, ou seja, GBNV na Índia (Reddy *et al.*, 1991; 1992; Satyanarayana *et al.*, 1996) e WSMoV no Japão e Taiwan (Yeh & Chang, 1995) (Tabela 1).

Inicialmente, a ocorrência do TSWV era restrita às regiões tropicais e subtropicais do mundo. Na Europa, o vírus foi detectado pela primeira vez no Reino Unido e no sul da França, antes da Primeira Guerra Mundial, assumindo grande importância na cultura do tomate nessas regiões. Após a Segunda Guerra Mundial, houve poucos relatos do vírus, adquirindo importância secundária. Entretanto, a partir de 1985, esse quadro sofreu enorme alteração, devido à introdução do tripses *Frankliniella occidentalis* Pergande na Europa, vindo provavelmente dos Estados Unidos, onde já era conhecido pela sua eficiência na transmissão do TSWV. Este vetor foi um dos possíveis causadores da rápida disseminação do vírus em hortaliças e ornamentais cultivadas nos Estados Unidos, no Canadá e, posteriormente, na Europa (Allen & Broadbent, 1986; Bournier & Bournier, 1987; Reddick *et al.*, 1987; Paterson *et al.*, 1989; Hagan *et al.*, 1990; Pitblado *et al.*, 1990; Marchoux *et al.*, 1991; Vaira *et al.*, 1993). A doença pode causar prejuízos de mais de um bilhão de dólares por ano (Goldbach & Peters, 1994). Na maioria dos casos, os danos econômicos podem ser severos, acarretando perdas significativas na produção. No Havaí, o TSWV afetou a produção de alface, pimentão e tomate, resultando em perdas na cultura da alface de 50 a 90%, independentemente da época do ano (Cho *et al.*, 1987).

Outra importante causa da disseminação dos tospovírus pelo mundo foi a capacidade do vírus em infectar grande variedade de espécies de plantas, tais como culturas agrícolas, olerícolas, plantas ornamentais e plantas invasoras. Os tospovírus apresentam círculo de hospedeiros distribuído em 92 famílias e em mais de 1.050 espécies botânicas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, com destaque para as famílias Compositae e Solanaceae (<http://www.oznet.ksu.edu/tosporavirus/hostlist.html>). Dentre os tospovírus, a espécie TSWV possui o mais amplo círculo de hospedeiros, abrangendo 1.090 espécies de plantas (Parrela *et al.*, 2003), enquanto as espécies INSV, GBNV e

WSMoV possuem círculo de hospedeiros restrito (Peters, 1998). Novos hospedeiros de tospovírus vêm sendo continuamente identificados. Dentre as culturas agrícolas de alto valor comercial infectadas naturalmente por tospovírus, citam-se: abacaxi, abóbora, abobrinha, alface, almeirão, amendoim, batata, berinjela, café, caupi, cebola, chuchu, ervilha, feijão, fumo, grão-de-bico, lentilha, mamão, melancia, pimenta, pimentão e tomate (revisado por Pozzer *et al.*, 1996); e entre as plantas ornamentais estão: begônia, cactus, calêndula, ciclamen, crisântemo, dália, estatice, gladiolo, gloxínia, impatiens, lisianthus, primavera, vinya e violeta (revisado por Pozzer *et al.*, 1996).

### **2.3. Ocorrência dos tospovírus no Brasil**

No Brasil, os primeiros relatos sobre a doença causada por tospovírus, conhecida como vira-cabeça, foram publicados por Azevedo (1936) e por Bitancourt (1936). A denominação desta doença como “vira-cabeça” foi relatada por Silberschmidt (1937), infectando fumo. No ano seguinte, Costa & Kiehl (1938) conseguiram transmitir mecanicamente o vírus. As primeiras evidências da identificação do vírus causador da doença vira-cabeça como sendo do grupo “spotted wilt” foi realizada por Costa & Forster (1941). Posteriormente, foram relatadas inúmeras ocorrências de tospovírus em diversas hospedeiras (Kitajima, 1986). Na região do Submédio São Francisco (PE), Moraes *et al.* (1986) relataram perdas de até 100% na cultura da alface, devido à infecção por TSWV. Em tomate, as cultivares para mesa (Santa Clara, Jumbo, Ângela Gigante) e para processamento industrial (IPA-5) são bastante suscetíveis aos tospovírus, agravando assim, os danos econômicos provocados por esse vírus. Em levantamento realizado na cultura de tomate na região do Submédio São Francisco, estimou-se perdas na produção em torno de 30%, resultantes da infecção por tospovírus, correspondendo a cerca de cinco milhões de dólares (de Ávila *et al.*, 1996). Em 1997, Fajardo *et al.* mediram o gradiente de dispersão da doença e a redução da produção em tomateiro industrial (IPA-5) infectado por tospovírus no Distrito Federal, mostrando reduções na produção de 84,4% para plantas com sintomas severos, em relação à produção total/planta.

Em 1995, Nagata *et al.* realizaram um levantamento da ocorrência de espécies de tospovírus em vários Estados brasileiros e relataram que nos

Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul predominavam as espécies TCSV e GRSV, enquanto no Distrito Federal e no Estado do Paraná predominava a espécie TSWV. A predominância de determinadas espécies de tospovírus numa determinada região geográfica sugere que as várias espécies se disseminaram com eficiência diferente nos estados brasileiros avaliados. Dentre as prováveis explicações para tal fato, citam-se a presença de diferentes plantas daninhas e culturas atuando como fonte do vírus e do vetor, assim como a distribuição de diferentes espécies de tripes em cada região geográfica e a especificidade da relação vírus-vetor (Pozzer, 1998; Nagata *et al.*, 2004).

O Brasil apresenta uma vasta diversidade genética de tospovírus. Durante as últimas décadas, além do TSWV, foram identificadas as espécies TCSV, GRSV e IYSV. Mais recentemente, duas outras espécies foram relatadas, uma infectando crisântemo (*Chrysanthemum* sp.) e outra infectando abóbora (*Cucurbita moschata*). Em 1994, produtores do município de Atibaia, São Paulo, observaram sintomas típicos de tospovírus em crisântemo. Posteriormente, este tospovírus foi denominado *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), sendo encontrado também na cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum*) em Minas Gerais e em tomate e crisântemo no Rio de Janeiro (Brioso *et al.*, 2004). Em 1991, outra espécie de tospovírus denominada *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), foi encontrada em campos experimentais de abóbora em São Paulo. Atualmente, grandes áreas têm sido afetadas por essa espécie, que vem se espalhando de São Paulo até a região central do Brasil. No Distrito Federal já foi descrita a ocorrência do ZLCV em campos comerciais de pepino (*Cucumis sativus*) (de Ávila *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1998; Bezerra *et al.*, 1999). Até o momento, foram relatadas seis espécies de tospovírus no Brasil, incluindo TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, ZLCV e IYSV, infectando culturas agrícolas, olerícolas e ornamentais

#### **2.4. Sintomatologia**

Tanto a suscetibilidade da hospedeira ao vírus quanto a severidade dos sintomas provocados por tospovírus variam conforme a idade, nutrição e genótipo da planta, a época da infecção, as condições edafo-climáticas e a espécie (isolado) de tospovírus. Os principais sintomas observados nas plantas

infectadas são: aparecimento de anéis cloróticos e necróticos nas folhas e nos frutos infectados, mosaico, arroxamento ou bronzeamento nas folhas, nanismo, deformação foliar, necrose severa das hastes e das folhas, seguida, muito freqüentemente, de morte da planta (Le, 1971; Matthews, 1982; de Ávila, 1992; Pozzer *et al.*, 1996). No tomateiro, os sintomas variam desde a coloração das folhas (bronzada ou amarelo-violácea), até à formação de manchas necróticas e/ou anéis necróticos nos folíolos. Os frutos podem apresentar anéis necróticos e/ou cloróticos, e a planta pode mostrar nanismo e encurvamento do ápice, sintoma que originou o nome da doença conhecida vulgarmente como “vira-cabeça” (Best, 1968; Francki & Hatta, 1981; Rosello *et al.*, 1994).

#### **2.4.1. Tospovírus em *Capsicum* spp.**

No Brasil, as tospoviroses representam doenças de grande importância nas culturas da pimenta e do pimentão, pois já foram descritas três espécies de tospovírus (TSWV, TCSV e GRSV) infectando *Capsicum* spp. naturalmente (Boiteux *et al.*, 1993; 1994). Em casa de vegetação, Cupertino *et al.* (1984) relataram que o pimentão (*Capsicum annuum*) sofre perdas de 49% a 69%, quando infectado por TSWV. O nível de incidência do vírus está relacionado com o desenvolvimento da população do inseto vetor e em geral atinge altos índices de disseminação.

Os sintomas provocados em pimenta (*Capsicum* spp.) 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, além de nanismo da planta (Boiteux *et al.*, 1993).

Foram relatadas fontes de resistência ao TSWV em algumas espécies de pimenta e tomate (*Lycopersicon esculentum*), que estão sendo utilizadas em programas de melhoramento genético (Boiteux & de Ávila, 1994). Considerando-se que genes de resistência contra TSWV ainda não foram encontrados em pimentão (*Capsicum annuum*), experimentos de melhoramento genético têm sido conduzidos utilizando germoplasma de *Capsicum chinense*, originário da Amazônia (Cheng *et al.*, 1989). Cupertino *et al.* (1988) foram os primeiros autores a reportar *C. chinense* ‘PI 159236’ como fonte de resistência a isolados brasileiros de TSWV. Mais tarde, foram

identificadas as principais fontes de resistência em *C. chinense* 'PI 159236' e 'PI 152225' (Black *et al.*, 1991), 'CNPH 275' ('Panca') (Boiteux *et al.*, 1993), 'PI 15' (Jorda *et al.*, 1994), 'C00943' (Hobbs *et al.*, 1994) e '7204' (Nuez *et al.*, 1994). Os testes de alelismo e de progenia realizados com esses acessos mostraram que a resistência do 'PI 152225', 'PI 159236' e 'CNPH 275' é monogênica, dominante e está localizada no mesmo locus, chamado *Tsw* (Boiteux, 1995; Black *et al.*, 1996; Moury *et al.*, 1997). Este gene é bastante estável e efetivo contra isolados da espécie de tospovírus TSWV, sendo a reação deste gene típica de hipersensibilidade e o gene de dominância simples (Boiteux, 1995). É também conhecido que isolados de outras espécies de tospovírus, como TCSV, GRSV, (Boiteux & de Ávila, 1993; Nagata *et al.*, 1993), INSV (Roggero *et al.*, 1999) e a espécie tentativa *Capsicum chlorosis virus* (McMichael *et al.*, 2002), causam infecção sistêmica em *C. chinense* 'PI159236' e 'PI152225'. Por outro lado, em experimentos de melhoramento genético, referentes à introdução do gene *Tsw* em várias cultivares de pimentas comerciais, foi observado que a resistência causada por este gene foi quebrada quando as plantas foram mantidas a altas temperaturas (acima de 28°C), além de ser dependente da idade da planta inoculada, sendo as plantas mais jovens mais suscetíveis ao vírus (Roggero *et al.*, 1996; Rosellò *et al.*, 1997; Moury *et al.*, 1997; Soler *et al.*, 1998).

### 3. Morfologia e organização genômica dos tospovírus

Estudos de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que os tospovírus possuem partículas quase isométricas (70-110 nm de diâmetro), circundadas por uma membrana lipídica com projeções formadas por duas glicoproteínas denominadas G1 e G2 (van Kammen *et al.*, 1966; Ie, 1971; Kitajima *et al.*, 1992) (Figura 1A).

O genoma dos membros do gênero *Tospovirus* é composto por três segmentos lineares de RNA fita simples, denominados S RNA (small), M RNA (medium) e L RNA (large) e cada segmento é encapsidado individualmente com a proteína do nucleocapsídeo, codificada pelo S RNA. Como as extremidades 3' e 5' de cada segmento de RNA são complementares entre si, a ribonucleoproteína forma uma estrutura estável, denominada "cabo de panela", que é responsável pela forma pseudocircular assumida pelas

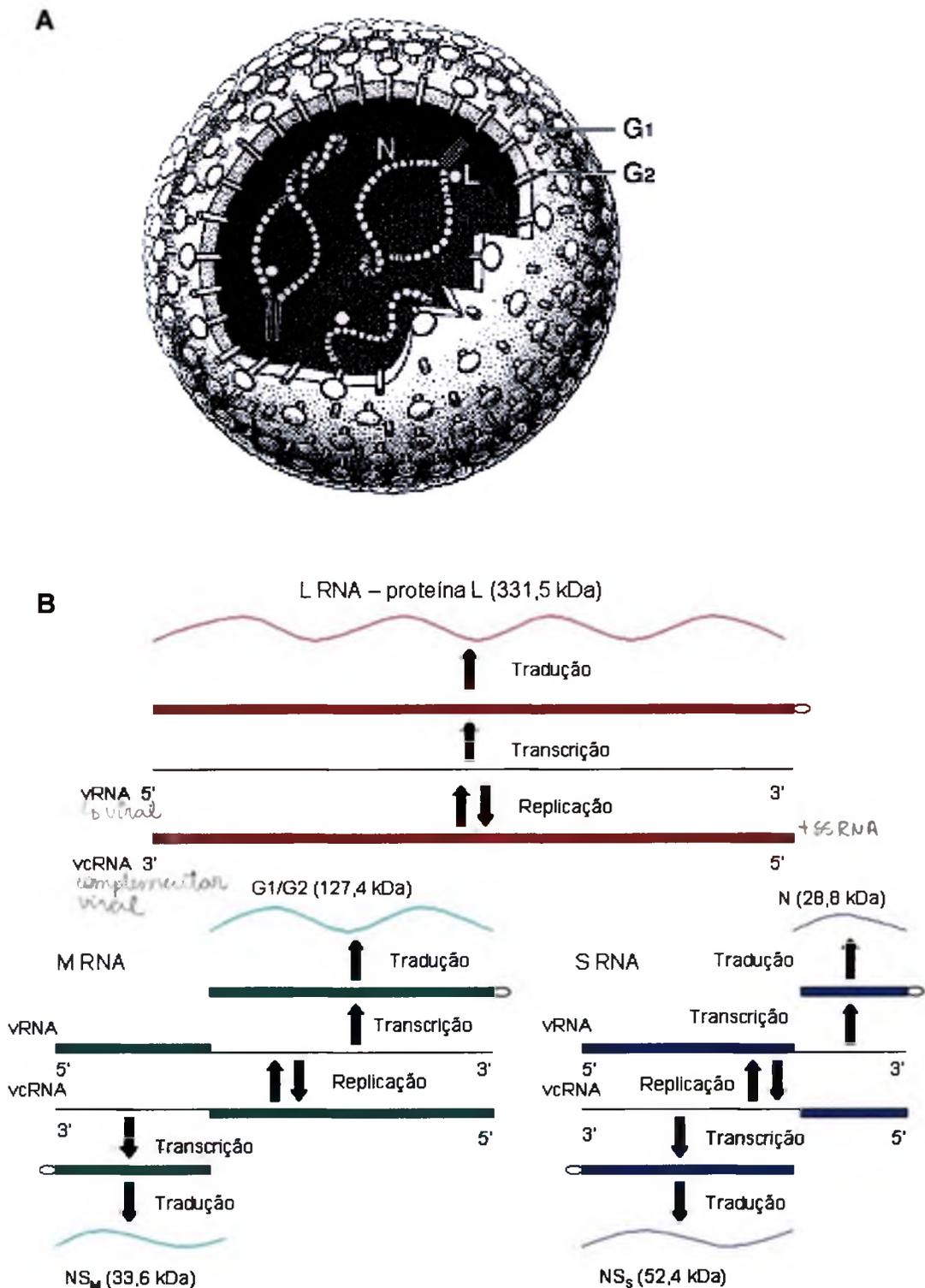
moléculas de RNA encapsidadas com a proteína do nucleocapsídeo (Figura 1A) (van den Hurk *et al.*, 1977; de Haan *et al.*, 1989; 1991; Peters *et al.*, 1991; Kormelink *et al.*, 1992a).

A determinação da seqüência de nucleotídeos do genoma do TSWV e de outras espécies permitiu que fosse elucidada a organização genômica dos tospovírus (Figura 1B). O genoma do TSWV apresenta cinco fases de leitura aberta ("ORF" ou "open reading frame"), que codificam seis proteínas virais funcionais. O L RNA consiste de 8.897 nucleotídeos, tem polaridade negativa e apresenta uma única ORF. Esta ORF codifica uma RNA polimerase RNA dependente (RdRp ou L) de 331,5 kDa, com ação de transcriptase viral e presente na partícula viral (van Poelwijk *et al.*, 1996; Chapman *et al.*, 2003). O M RNA apresenta 4.883 nucleotídeos e sua estratégia de codificação é ambisenso. Apresenta duas ORFs, uma no sentido viral, codificando uma proteína não estrutural de movimento do tipo célula-célula (NS<sub>M</sub>) de 33,6 kDa (Storms, 1998), e outra no sentido viral complementar, codificando um precursor para as glicoproteínas associadas à membrana lipídica (G1, com 78 kDa, e G2, com 55 kDa) (Kormelink *et al.*, 1992a). O S RNA possui 2.997 nucleotídeos e estratégia ambisenso, apresentando duas ORFs, uma que codifica a proteína não estrutural (NS<sub>S</sub>) de 52,4 kDa no sentido viral e a proteína do nucleocapsídeo (N) de 28,8 kDa no sentido viral complementar (de Haan *et al.*, 1990) (Figura 1). A função da proteína NS<sub>S</sub> foi descoberta há pouco tempo atrás por Takeda *et al.* (2002) utilizando um ensaio de supressão transiente baseado na "green fluorescent protein" (GFP). De acordo com os resultados gerados, a proteína NS<sub>S</sub> suprimiu o silenciamento pós transcricional do gene GFP ("post-transcriptional gene silencing" ou PTGS), induzido por transgene GFP senso, mas não suprimiu o PTGS induzido por transgene invertido e repetido. Finalmente, foi demonstrado então que a proteína NS<sub>S</sub> do TSWV apresentou uma atividade supressora do silenciamento do RNA.

A expressão da proteína codificada pelo L RNA ocorre através da síntese de um único mRNA, enquanto a expressão daquelas proteínas codificadas pelo M RNA e pelo S RNA acontece pela síntese de mRNAs subgenômicos, transcritos de fitas complementares e iniciados pelo processo de "cap-snatching", similar ao que ocorre em outros gêneros da família *Bunyaviridae* (Bishop *et al.*, 1983; Kormelink *et al.*, 1992b). Este mecanismo é

realizado pela polimerase viral e consiste na adição de seqüências heterogêneas do RNA mensageiro da célula vegetal (12 a 20 nucleotídeos) à extremidade 5' do RNA do vírus. Esta seqüência funciona como iniciador usado pela RdRp para iniciar a transcrição (Kormelink *et al.*, 1992b; van Poelwijk *et al.*, 1996; Duijsings *et al.*, 1999). Um estudo sobre os requerimentos de seqüências líder cap doadoras do hospedeiro usadas durante o início da transcrição do TSWV foi conduzido por Duijsings *et al.* (2001), revelando que o comprimento das seqüências clivadas do doador (*Alfafa mosaic virus*), variaram de 13 a 18 nucleotídeos, e que a clivagem aconteceu preferencialmente no nucleotídeo adenina. Em 2002, van Knippenberg *et al.* mostraram que partículas purificadas do TSWV suportaram tanto a replicação do genoma quanto a transcrição *in vitro*, dependendo das condições do ensaio. A transcrição somente ocorreu após a adição de lisados de reticulócitos de coelho, indicando sua dependência para a tradução. O seqüenciamento dos transcritos produzidos demonstrou a presença de seqüências líder não virais nas suas extremidades 5', confirmando desta maneira o início da transcrição viral pelo processo "cap snatching".

Entre os genes NS<sub>M</sub> e precursores das glicoproteínas do M RNA e entre os genes N e NS<sub>S</sub> do S RNA existe uma região rica em bases adenina e uracila que forma uma seqüência complementar longa e invertida entre si, ou seja, uma estrutura secundária em forma de "hairpin" ou "loop", chamada região intergênica. Acredita-se que nesta região possa haver seqüências-sinais para o término da transcrição, como por exemplo, pequenas seqüências ricas em uracila (Schneemann *et al.*, 1994).

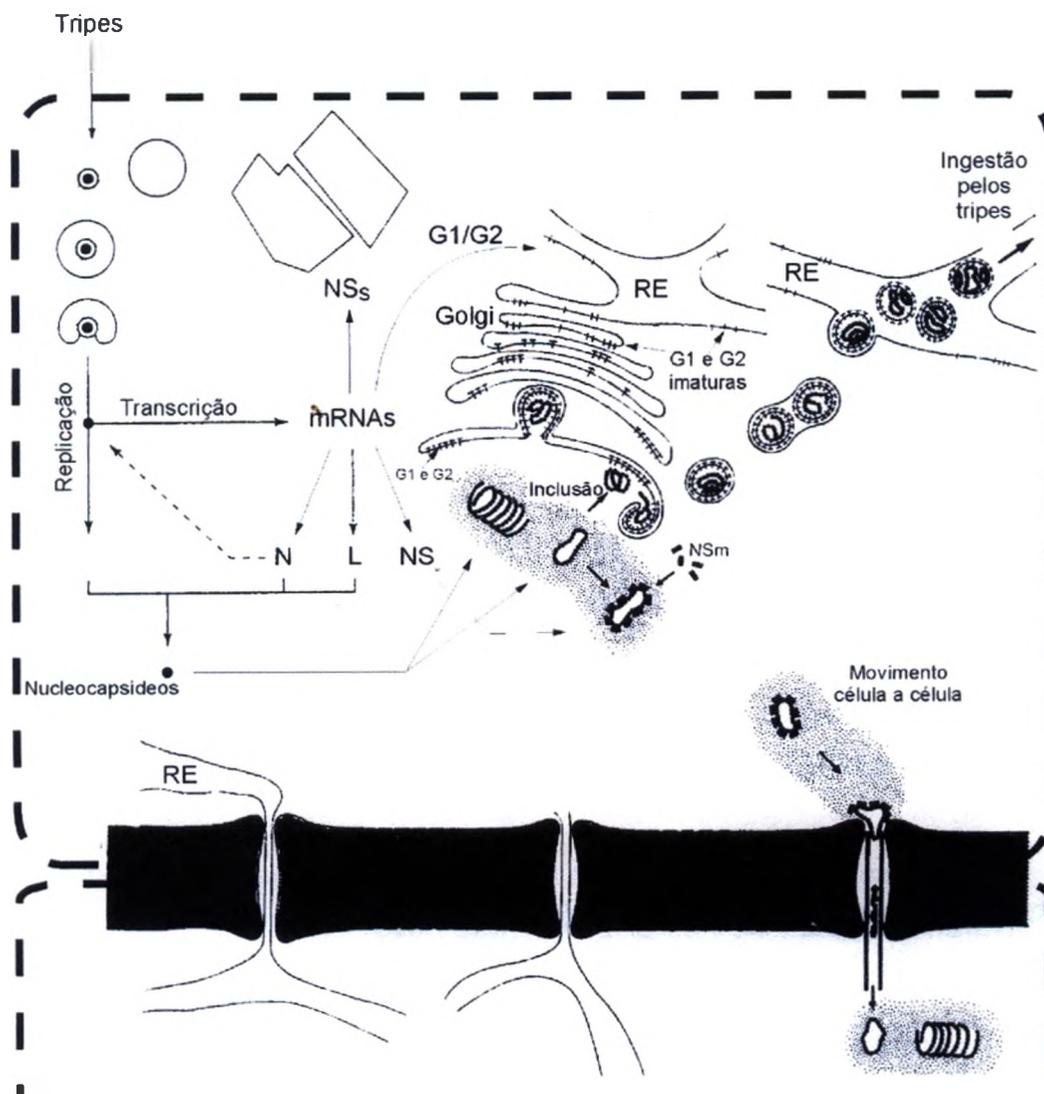


**Figura 1.** Morfologia (A) e organização genômica (B) da espécie de *Tospovirus Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Figura A adaptada de Prins e Kormelink ([www.agro.wageningen-ur.nl/viro/research/t\\_1\\_3.html](http://www.agro.wageningen-ur.nl/viro/research/t_1_3.html), 1998). N = Nucleoproteína viral; L = Polimerase viral; G1 e G2 = Glicoproteínas virais.

#### 4. Ciclo de Infecção dos tospovírus na planta

No processo de infecção viral, os tospovírus são introduzidos na planta pelo tripses vetor. Nas células vegetais, as partículas possivelmente perdem seus envelopes por ação de lisossomos, liberando os nucleocapsídeos juntamente com a polimerase viral no citoplasma. O complexo ribonucleoproteína provavelmente se mantém ligado ao RNA viral, que permanece exposto para fora do complexo. Este RNA, que apresenta polaridade negativa, é transcrito pela polimerase L do vírus, produzindo a fita positiva a ser traduzida. É postulado, à semelhança do que ocorre para outros gêneros da família *Bunyaviridae*, que a concentração da proteína N no citoplasma das células regula a ativação da polimerase viral L. No início da infecção, quando a concentração da proteína N é baixa, a polimerase viral inicia a produção de RNA viral mensageiro que é traduzido para produzir as proteínas estruturais G1, G2, L e N e não estruturais NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub>. À medida que o processo de infecção avança, a concentração da proteína N aumenta e a polimerase viral L passa a mediar a replicação do vírus produzindo RNA viral genômico (Kormelink *et al.*, 1992b). O RNA viral genômico recém-sintetizado se associa com a proteína N e a algumas cópias da polimerase L, resultando na formação de nucleocapsídeos. Os nucleocapsídeos acumulam-se nas membranas do complexo de Golgi, enquanto as glicoproteínas virais G1 e G2 direcionam-se para o retículo endoplasmático rugoso, onde são glicosiladas e processadas. Em seguida, as glicoproteínas são modificadas no complexo de Golgi, encontrando-se com os nucleocapsídeos, ao mesmo tempo em que as membranas do complexo de Golgi são modificadas para formar membranas paralelas pareadas. A seguir, são formadas partículas virais com duplo envelope através de um processo chamado “wrapping” das glicoproteínas virais contendo membranas que envolvem os nucleocapsídeos (Kikkert, 1999). Em um estágio tardio de maturação, as partículas com duplo envelope fundem-se umas às outras e ligam-se especificamente às membranas do retículo endoplasmático. Isto resulta na formação de partículas com envelope simples que se acumulam dentro do retículo endoplasmático (Figura 2) (Kikkert *et al.*, 1999). Após a montagem das partículas completas do vírus, elas estão aptas para serem adquiridas pelo tripses vetor e serem transmitidas para outras plantas (Wijkamp, 1995).

O ciclo de infecção completo dos tospovírus na mesma planta ocorre quando os vírus se movimentam de célula-a-célula na forma de nucleocapsídeos sem envelope, via plasmodesmata, com o auxílio da proteína de movimento NS<sub>M</sub> e de prováveis fatores celulares ainda não elucidados. A proteína NS<sub>M</sub> media o movimento célula-célula através da produção de estruturas tubulares que atravessam o plasmodesmata (Kormelink *et al.*, 1994; Storms, 1998). Quando o vírus atinge as células companheiras dos elementos crivados do floema pode entrar no tecido vascular e infectar sistemicamente a planta.



**Figura 2.** Ciclo de infecção dos tospovírus na célula vegetal (adaptado de Cortez, 1999). N = Nucleoproteína viral; L = Polimerase viral; G1 e G2 = Glicoproteínas virais; NSm = Proteína não estrutural de movimento célula a célula; NS<sub>s</sub> = Proteína não estrutural supressora do silenciamento pós-transcricional do RNA; RE = Reticulo endoplasmático; mRNAs = RNAs mensageiros.

## 5. Transmissão e ciclo de infecção dos tospovírus no inseto vetor

Na natureza, o vírus é transmitido de maneira circulativa/propagativa por insetos denominados tripses, classificados na ordem Thysanoptera, família Thripidae, sendo as principais espécies transmissoras pertencentes aos gêneros *Thrips* e *Frankliniella* (Sakimura, 1963; Yeh *et al.*, 1992; Wijkamp *et al.*, 1995). Atualmente, dentre as mais de 5000 espécies de tripses relatadas no mundo, somente nove espécies foram reportadas como vetores de tospovírus. No Brasil, foram identificadas as seguintes espécies transmissoras de tospovírus: *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schultzei*, *Thrips tabaci* e *Thrips palmi* (Nagata *et al.*, 1999b). Recentemente, Nagata *et al.* (2004) estudaram a competência dessas quatro espécies de tripses durante a transmissão e replicação de quatro espécies de tospovírus (TSWV, TCSV, GRSV e CSNV), e verificaram que populações de *F. occidentalis* transmitiram as quatro espécies com diferente eficiência, enquanto que as de *F. schultzei* transmitiram TCSV, GRSV e CSNV. Por outro lado, as populações de *T. tabaci* e *T. palmi* não transmitiram nenhuma das espécies estudadas.

O ciclo de vida das espécies de tripses *Frankliniella occidentalis* e *Thrips tabaci* dura cerca de 15 a 60 dias e consiste dos estádios: ovo, larva 1, larva 2, pré-pupa, pupa e adulto. A duração de cada fase depende da temperatura, da disponibilidade de alimento e da espécie do hospedeiro (Lacasa, 1990; Rosello *et al.*, 1994). Primeiramente, a fêmea insere os ovos nas folhas, frutos ou pétalas mediante uma incisão feita pelo oviscapto. Após a eclosão dos ovos (2 a 4 dias depois da postura), surge a primeira fase de larva (primeiro ínstar), com 2 a 7 dias de duração, seguida pela segunda fase de larva (segundo ínstar), com 3 a 12 dias. A próxima fase chama-se pré-pupa, com duração de 1 a 3 dias, seguida da fase de pupa, com 2 a 4 dias, e finalmente o inseto atinge o estadio adulto (Grasselly *et al.*, 1990; Lacasa, 1990; Rosello *et al.*, 1994).

A transmissão do tospovírus pelo tripses só ocorre se o vetor adquirir o vírus no estágio de larva, especialmente no primeiro estágio (Ullman *et al.*, 1992a e b). Nesta fase, o inseto possui elevada mobilidade e apetite voraz. Do final da segunda fase de larva para a fase de pré-pupa, o inseto vai deixando de se mover e de se alimentar, gradativamente. No final da fase de pré-pupa e na fase de pupa, o tripses não se movimenta nem come, deixando de transmitir o vírus. Então, a habilidade de adquirir o vírus declina rapidamente ao longo do

desenvolvimento pupal. Após a aquisição, o vírus se replica e circula no corpo do inseto tripes e é transmitido no segundo estágio de larva e adulto (Ullman et al., 1997). O vírus é transmitido quando a saliva do tripes é ejetada dentro do tecido das plantas sadias. O processo entre a primeira ingestão do vírus pelo tripes e a inoculação requer um período de latência dependente de temperatura (Wijkamp & Peters, 1993; Kritzman et al., 2002).

Para que o vírus seja transmitido com sucesso, ele precisa passar por diversas barreiras dentro do corpo do tripes. Em 1999a, Nagata et al. estudaram o desenvolvimento da infecção do TSWV nas glândulas salivares e no intestino médio de tripes (*Frankliniella occidentalis*) transmissores e não transmissores do vírus, com o intuito de elucidar o tropismo dos tecidos, assim como a rota do vírus dentro do corpo do inseto. Neste estudo foram usadas técnicas de imunocitoquímica, mostrando que o acúmulo do vírus acontece no intestino médio, no intestino posterior e nas glândulas salivares. Os primeiros sinais da infecção foram encontrados nas células epiteliais do intestino médio, principalmente na região anterior. Posteriormente, o vírus (em estágio de larva tardio) se espalhou pelos tecidos musculares do intestino médio longitudinal e circular. No estágio adulto, o vírus ocorreu nos tecidos musculares viscerais, que cobrem inteiramente os intestinos médio e posterior, e foi então observado no epitélio do intestino médio. Após 72 horas de aquisição do vírus pelo vetor, houve a detecção dos vírus nas glândulas salivares e nos ligamentos que conectam o intestino médio às glândulas salivares, simultaneamente. As glândulas salivares de indivíduos transmissores apareceram intensamente ou completamente marcadas, enquanto as glândulas de indivíduos não transmissores encontraram-se sem nenhuma ou com baixo nível de marcação. Além disso, foi observado que somente no segundo estágio larval e no estágio adulto houve o desenvolvimento de barreiras no intestino médio dependente da idade do tripes contra a infecção do vírus. Esses resultados mostraram que o estabelecimento da infecção por TSWV em vários tecidos, assim como o potencial de transmissão, parecem ser regulados por diferentes barreiras e processos relacionados com a metamorfose do tripes.

Recentemente, Kritzman et al. (2002) conduziram um estudo sobre a rota do TSWV dentro do corpo do tripes ao longo do seu desenvolvimento e sua relação com a eficiência de transmissão do vírus. Neste trabalho, foi

observado que a intensidade da infecção causada por TSWV em vários órgãos de duas espécies de tripes (*F. occidentalis* e *T. tabaci*) foi relacionada positivamente com a eficiência de transmissão.

## 6. Interações celulares entre tripes e tospovírus

Apesar da provável existência de barreiras à circulação do tospovírus no corpo do tripe, supõem-se que a entrada do vírus pelas células do intestino do inseto é mediada por uma interação entre receptores de membrana do tecido do intestino apical e proteínas do M RNA do TSWV, em analogia ao que acontece com outros membros da família *Bunyaviridae*. Em vista disso, provavelmente as glicoproteínas são as proteínas virais que possuem a função de adesão às células dos vetores, interagindo com os receptores celulares dos tripes. É conhecido que partículas de tospovírus deficientes em envelope, ou seja, sem a membrana lipo-glicoproteica (Resende *et al.*, 1991b), induzem infecção sistêmica na planta, mas não são transmitidas por tripes (Wijkamp, 1995). Adicionalmente, Kormelink *et al.* (1992a) observaram a existência de uma seqüência de aminoácidos específica na glicoproteína 2, ou seja um motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), comum em moléculas de adesão celular. Em 1995, Ullman *et al.* utilizando microscopia eletrônica e imunolocalização, demonstraram que ocorre a fusão das partículas do TSWV com a membrana apical das células epiteliais do intestino médio dos tripes. Enquanto a proteína N e os RNAs virais entram na célula, as glicoproteínas permanecem nesta membrana. Esses autores sugerem que a disseminação do TSWV no corpo do tripe acontece célula-a-célula, como um complexo ribonucleoproteína viral-RNA.

Mais tarde, foi relatado por Bandla *et al.* (1998) a existência de uma proteína (com cerca de 50 kDa) na membrana plasmática do intestino das larvas do tripe *F. occidentalis*, ligando-se especificamente às glicoproteínas do TSWV. Em teste de "western-blotting" utilizando tripes, essa proteína apresentou intensidade de reação aos anticorpos específicos, variando de muito forte a fraca, nos estádios de larva e adulto, respectivamente. Os mesmos autores concluíram que a concentração do receptor celular varia de acordo com a idade do inseto. Tal relato reforça a idéia de que as

glicoproteínas funcionam como proteínas virais de ligação do vírus às células do tripes.

No mesmo período, Kikkert *et al.* (1998) observaram que, em todas as fases do desenvolvimento de *F. occidentalis* e *T. tabaci*, havia a presença de uma proteína de 98 kDa ligando-se a anticorpos contra a proteína G2. Entretanto, essa proteína não foi detectada preferencialmente no intestino do tripes e sim distribuída ao longo do seu corpo. Tais evidências sugerem que esta proteína não desempenha função importante durante a entrada do vírus no vetor, mas assume papel relevante na circulação do vírus pelo corpo do inseto.

A habilidade dos tospovírus em infectar a planta e seu inseto vetor, tripes, tem sido objeto freqüente de estudos nos últimos anos. Medeiros *et al.* (2004) sugeriram que a infecção causada por TSWV no tripes *Frankliniella occidentalis* ativou resposta imunológica no vetor. Usando bibliotecas de cDNA subtrativas para hibridizar com sondas de DNA do tripes *F. occidentalis* através de “macroarrays”, foram identificados genes que codificam peptídeos antimicrobianos, como defensina e cecropina, genes envolvidos no reconhecimento de patógenos, como lectinas, receptores que ativam e inativam a resposta imune, como Toll-3, e genes integrantes da via metabólica de transdução de sinal ativada por receptores tipo Toll, como quinase JNK. Muitos desses genes foram ativados ao mesmo tempo em que a replicação viral foi primeiramente detectada por RT-PCR.

## **7. Replicação do TSWV em células de inseto**

A entrada do vírus na célula do inseto mediada por receptor pode acontecer através de dois prováveis mecanismos (White, 1990). No primeiro, existe uma interação proteína viral – receptor, que induz a formação de um endossoma. No segundo, há a interação da proteína viral de adesão com o receptor, resultando na fusão do vírus com a membrana da célula e na liberação dos RNAs do vírus no citoplasma da célula.

A via de entrada dos tospovírus nas células do epitélio do intestino de *F. occidentalis* parece ocorrer de acordo com o segundo mecanismo (Ullman *et al.*, 1997). Após a decapsidação e liberação dos RNAs, ocorreria a transcrição seguida pela tradução dos três segmentos de RNA (L, M e S) e pela posterior

replicação do genoma viral. A montagem das partículas virais envelopadas parece ser um evento transiente ocorrido no labirinto basal e nos tecidos musculares viscerais do intestino médio da larva do tripes. A partícula viral completa parece brotar a partir da membrana basal das células epiteliais do intestino médio para dentro do espaço extracelular do labirinto basal do vetor (Nagata *et al.*, 2002).

Os primeiros estudos realizados com tripes indicavam que apenas os adultos podiam transmitir o vírus e tornavam-se infecciosos quando o vírus fosse adquirido somente no primeiro ínstar larval (Best, 1968). Ao longo dos anos, outros trabalhos demonstraram que insetos do segundo ínstar também podem adquirir o vírus e transformar-se em adultos transmissores (Wijkamp *et al.*, 1993). Além disso, foi descoberto que alguns tripes conseguem transmitir o vírus quando se encontram no segundo ínstar e a aquisição é feita ainda no primeiro ínstar larval (Wijkamp & Peters, 1993). Em 1997, Ullman *et al.* sugeriram que a capacidade de aquisição do TSWV apenas nos estádios larvais estaria relacionada com a presença do receptor unicamente nesses estádios. Recentemente, estudos de competência de população de *T. tabaci* e de *F. occidentalis* na transmissão do TSWV, conduzidos por Nagata *et al.* (2002) através de microscopia eletrônica, revelaram a ocorrência do brotamento de algumas partículas virais a partir da membrana basal das células epiteliais do intestino de *F. occidentalis* dentro do espaço extracelular do labirinto basal. As partículas virais envelopadas foram visualizadas também nas células musculares do intestino de larvas de *F. occidentalis*. Estes resultados mostraram que a taxa de replicação viral no intestino e a migração viral do intestino para outras células viscerais e para as glândulas salivares são fatores fundamentais na determinação da competência do vetor.

Os resultados preliminares da pesquisa sugeriam que o modo de propagação dos tospovírus pelo tripes era do tipo circulativo (Best, 1968). Posteriormente, vários autores demonstraram o carácter propagativo do tospovírus com o tripes. Os estudos feitos por Ullman *et al.* (1992a; b) e Wijkamp *et al.* (1993) mostraram que se os vírions de TSWV fossem adquiridos no primeiro ínstar larval de *F. occidentalis*, a proteína do nucleocapsídeo seria detectada no estágio adulto do vetor em vários tecidos, principalmente nas células do epitélio dos intestinos, nas células dos músculos que envolvem o

canal alimentar e nas glândulas salivares. Ullman *et al.* (1992a) relataram que para os tripes serem transmissores é necessário que as glândulas salivares estejam infectadas com vírions. Esses experimentos somados à realização de testes de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) usando anticorpos policlonais para a proteína N em tripes individuais e de testes de hibridização utilizando sondas de cDNA específicas para a replicase viral (RdRp) revelaram fortes evidências sobre a ocorrência da replicação do tospovírus no tripe (Cho *et al.*, 1991; German *et al.*, 1991; 1992). Os resultados conclusivos só foram alcançados após a obtenção do anti-soro para a proteína não estrutural NS<sub>S</sub>. Esta proteína foi detectada nas células do epitélio do intestino do inseto e nas glândulas salivares, apresentando aspecto de estrutura fibrosa paracristalina, quando foi realizada imunomicroscopia eletrônica com o anti-soro específico (Kitajima *et al.*, 1992). Os autores constataram ainda que a proteína NS<sub>S</sub> só é detectada à medida que os tripes se tornam infecciosos, aumentando a sua concentração desde o estágio de larva até o de adulto (Ullman *et al.*, 1993; Wijkamp *et al.*, 1993). Apesar da proteína NS<sub>S</sub> ser codificada pelo vírus, ela não é estrutural e sua acumulação só acontece após a transcrição do mRNA, sugerindo-se que ocorre multiplicação do vírus no corpo do inseto. Portanto, o modo de propagação dos tospovírus no tripe é do tipo circulativo-propagativo.

## **8. Glicoproteínas do gênero *Bunyavirus***

As glicoproteínas virais G1 e G2 estão presentes na superfície das partículas virais e são codificadas pelo segmento M RNA de todos os bunyavírus. Elas desempenham papel fundamental no ciclo de vida dos bunyavírus nas células animais e apresentam uma série de características e funções, tais como: direcionam o sítio de morfogênese da partícula viral acumulando-se em membranas celulares particulares; interagem com o núcleo do nucleocapsídeo; apresentam atividade de hemaglutinação; são proteínas que interagem com receptores presentes na superfície das células de insetos vetores e células de hospedeiros suscetíveis; influenciam a transmissão do vírus pelo vetor através do direcionamento da entrada inicial do vírus dentro da célula do vetor; e guiam o vírus durante a circulação pelo corpo do inseto. Como visto, as glicoproteínas virais desempenham funções importantes para a virulência do vírus (Kikkert, 1999).

O produto da tradução do gene precursor das glicoproteínas dos bunyavírus foi identificado após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Neste gel foram diferenciadas duas proteínas com pesos moleculares distintos, designadas G1 e G2. A proteína G1 apresenta maior peso molecular e migra lentamente no gel e a proteína G2 possui menor peso molecular e migra rapidamente no gel. Essa nomenclatura tem gerado confusão no meio científico pelo fato da posição das glicoproteínas no gene precursor dos membros da família *Bunyaviridae* ser diferente em cada gênero ou mesmo dentro do mesmo gênero. Foi proposto recentemente que as proteínas G1 e G2 sejam denominadas respectivamente  $G_N$  e  $G_C$ , de acordo com a posição que essas proteínas assumem no precursor, seja na extremidade amina ou na extremidade carbóxi, principalmente nos bunyavírus animais (Lappin *et al.*, 1994). Entretanto, o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus ainda não aprovou oficialmente esta nova nomenclatura.

Alguns bunyavírus que infectam animais têm sido estudados em relação à seqüência, tradução, clivagem, topologia espacial, glicosilação, oligomerização, transporte e retenção das suas glicoproteínas (Elliott, 1996). Apesar da topologia das seqüências hidrofóbicas serem similares na maioria dos precursores, o comprimento das glicoproteínas individuais diferem bastante entre os diferentes gêneros. A estratégia de codificação das glicoproteínas do gênero *Nairovirus* parece ser mais complexa que as dos demais gêneros, pois foram descobertos genes intermediários além dos genes das proteínas  $G_N$  e  $G_C$  durante a infecção de vários membros deste gênero em animais (Marriot *et al.*, 1992).

Foi descoberto que as glicoproteínas dos bunyavírus são glicosiladas com oligossacarídeos ricos em manose e oligossacarídeos complexos tipo glicano, o que se refere ao aumento da taxa do resíduo de açúcar processado no complexo de Golgi e retículo endoplasmático, dependendo da glicoproteína e do vírus. Diferentes glicanos processados podem se ligar a uma proteína (Elliott, 1996). A proteína  $G_C$  do *Uukuniemi virus* contém uma mistura de oligossacarídeos ricos em manose e oligossacarídeos complexos tipo glicano, enquanto a proteína  $G_N$  contém apenas oligossacarídeos complexos tipo glicano (Pesonen *et al.*, 1982). Além das glicoproteínas do *Uukuniemi virus* serem glicosiladas, elas são também dobradas.  $G_N$  dobra-se rapidamente, em

10 minutos, com a ajuda da chaperonina BiP (ER luminal chaperone) e da proteína dissulfeto isomerase (PDI) (Persson & Pettersson, 1991; Pettersson *et al.*, 1993). Após terem sido dobradas corretamente, G<sub>N</sub> e G<sub>C</sub> formam heterodímeros no retículo endoplasmático, mas esses dímeros não são necessariamente derivados do mesmo precursor, devido à diferença de velocidade no dobramento das glicoproteínas. O subsequente transporte das glicoproteínas para o complexo de Golgi é lenta (30-45 minutos), sendo a causa dessa ocorrência ainda desconhecida.

A acumulação das glicoproteínas dos bunyavírus no complexo de Golgi é provavelmente devido a um sinal de retenção no Golgi, o qual previne que a proteína seja transportada à membrana plasmática, como geralmente acontece com proteínas que tenham entrado na via metabólica de secreção. A localização desse sinal foi examinada para os *Uukuniemi virus* e *Punta Toro virus* e foi encontrado uma porção de aminoácidos na cauda citoplasmática do G<sub>N</sub>, perto do domínio transmembrânico, que parece estar envolvido com esta função (Matsuoka *et al.*, 1996; Andersson *et al.*, 1997).

## 9. Glicoproteínas do gênero *Tospovirus*

O seqüenciamento completo das glicoproteínas de seis espécies de tospovírus permitiu que fossem comparadas as seqüências de aminoácidos das glicoproteínas dos tospovírus com as dos bunyavírus, encontrando-se uma baixa identidade entre elas, exceto por uma região de aminoácidos idêntica entre as glicoproteínas G2 da espécie-tipo TSWV e a de outros membros do gênero *Bunyavirus*, denominada motivo RGD (Arg-Gly-Asp) (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Sugere-se que este motivo esteja envolvido na ligação do vírus ao receptor presente nas células do vetor, sendo localizado na extremidade N-terminal da G2 do TSWV (Kormelink *et al.*, 1992a), análogo ao motivo das glicoproteínas G2 do tospovírus INSV (Law *et al.*, 1992), dos bunyavírus *Germiston* (Pardigon *et al.*, 1988) e *Snow Shoe Hair* (Eshita & Bishop, 1984), e phlebovírus *Punta Toro* (Ihara *et al.*, 1985). Comparações feitas usando-se o programa BLAST (NCBI), revelaram uma similaridade significativa entre as extremidades C-terminal das proteínas G1 dos tospovírus e as de seus análogos bunyavírus, sugerindo uma homologia funcional para essas proteínas (Cortez *et al.*, 2002).

Até hoje, existem poucos relatos de estudos referentes à expressão e processamento das glicoproteínas dos tospovírus. A expressão do precursor das glicoproteínas do TSWV em sistema de expressão baculovírus resultou na clivagem do precursor, apesar de se mostrar menos eficiente que em infecções na célula vegetal (Kormelink, 1994; Adkins *et al.*, 1996). As proteínas, incluindo o precursor, foram glicosiladas em células Sf21 e a localização subcelular das glicoproteínas do TSWV mostrou coloração da membrana plasmática, sugerindo que as glicoproteínas seriam transportadas para a superfície celular. Por outro lado, a coloração do núcleo dessas células mostrou que o citoplasma da célula do baculovírus infectada foi comprimido a um pequeno anel envolvendo o núcleo extremamente largo. A localização das glicoproteínas em células de baculovírus infectadas se mantém duvidosa.

O transporte, oligomerização e localização das glicoproteínas durante a infecção alternada da célula vegetal e da célula do inseto vetor ainda permanecem desconhecidos. As informações acumuladas até o momento sugerem que a topologia das glicoproteínas do TSWV se assemelha à topologia das glicoproteínas dos bunyavírus (Kikkert, 1999).

Recentemente, Naidu *et al.* (2004) conduziram um trabalho relacionado com as propriedades de ligação das lectinas às glicoproteínas do TSWV e à sensibilidade das glicoproteínas às glicosidases, visando obter informações sobre a natureza dos oligossacarídeos presentes em ambas as glicoproteínas. Os resultados obtidos neste estudo indicaram a presença de oligossacarídeos ricos em manose e oligossacarídeos complexos N-glicosilados (asparagina) na glicoproteína G2 e, possivelmente, oligossacarídeos complexos na glicoproteína G1 do TSWV. Neste estudo, foram observadas diferenças na extensão da ligação das glicoproteínas a diferentes lectinas, sugerindo que a G2 foi mais freqüentemente N-glicosilada do que a G1. Além disso, nenhuma evidência foi observada de O-glicosilação nas glicoproteínas de TSWV.

## 10. Controle dos tospovírus

Os procedimentos de controle de viroses 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, a proteção cruzada e o uso de cultivares resistentes ou tolerantes.

Dentre as estratégias de controle dos tospovírus, destaca-se o combate ao trips vetor mediante o uso de inseticidas, apesar desse método ser pouco eficiente. Em experimento realizado em cultura de alface infectada com TSWV, foram avaliados 26 inseticidas para o combate do trips. De acordo com os resultados mostrados, nenhum deles evitou a ocorrência de infecção por TSWV, e para que a população de trips fosse suprimida, foi necessária a aplicação semanal do inseticida uma ou duas vezes (Cho *et al.*, 1989). Alguns autores sugerem que esses resultados negativos ocorram devido a determinados fatores, como: a migração dos insetos vetores para outras plantas não pulverizadas, funcionando como reservatórios do vírus (Costa, 1995), a inoculação do vírus pelo trips antes que o inseticida tenha a possibilidade de atuar (Cho *et al.*, 1989), assim como a rápida aquisição de resistência aos inseticidas pelos trips (German *et al.*, 1992). Além desses fatores limitantes ao uso de inseticidas, a aplicação destes na época inadequada, a maneira exagerada de aplicação de certos produtos, tanto na dose quanto na frequência das aplicações, provocam problemas ambientais e econômicos (Gonçalves & Guimarães, 1995).

Na busca de alternativas para o controle do trips através de inseticidas, diversos estudos têm sido conduzidos, como o uso de fungos entomopatogênicos e predadores do trips (percevejo *Orius armatus*) como agentes do controle biológico (Cook *et al.*, 1995; Tavella *et al.*, 1995), a utilização de irradiação (Bansiddhi & Siriphontangmun, 1995), extrato de plantas (Noronha *et al.*, 1989; Matsunaga *et al.*, 1992; Nagai *et al.*, 1992; Zavaleta-Mejía *et al.*, 1995), voláteis químicos (Roditakis & Lykouressis, 1995) e reguladores de crescimento do inseto (Parrela & Murphy, 1995).

A utilização da resistência genética para o controle de doenças vegetais representou um grande avanço tecnológico da agricultura. Durante a elaboração de um programa de melhoramento genético, a primeira etapa é a

identificação do material vegetal que fornecerá os genes de resistência. A existência de distintas espécies de tospovírus dificulta a obtenção de boas fontes naturais de resistência (Law & Moyer, 1990; Reddy *et al.*, 1992; Yeh *et al.*, 1992; de Ávila *et al.*, 1993). As fontes de resistência a tospovírus vêm sendo estudadas há anos por diversos autores e têm sido identificadas em *Lycopersicon peruvianum* (Smith, 1944; Finlay, 1953; Stevens, 1964; Cupertino *et al.*, 1986; Paterson *et al.*, 1989; Iziuka *et al.*, 1993), em *L. hirsutum* (Araújo *et al.*, 1983; Maluf *et al.*, 1991; Boiteux & Giordano, 1992), e em *L. pimpinellifolium* (Smith, 1944; Kikuta & Frazier, 1946; Finlay, 1953; Cupertino *et al.*, 1986; Paterson *et al.*, 1989; Maluf *et al.*, 1991). Foi encontrada resistência a tospovírus em *L. esculentum*, nas cultivares “Rey de los Tempranos” e “Manzana” (Homes, 1948), sendo que em “Rey de los Tempranos” a resistência parece ser controlada por alelo(s) recessivo(s) (Maluf *et al.*, 1991).

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 (Finlay, 1952; 1953; Paterson *et al.*, 1989). No Brasil, foram pesquisadas populações derivadas da cultivar sul-africana “Stevens” (Van Zijl *et al.*, 1986; Stevens *et al.*, 1992), cuja fonte de resistência foi *L. peruvianum* (Stevens, 1964). Estas populações apresentam o gene de resistência (Sw-5), contra amplo espectro de tospovírus, e têm sido usadas em vários programas de melhoramento genético (Boiteux & Giordano, 1993). No entanto, já foi relatado acúmulo de partículas virais em genótipos portadores do gene Sw-5, seguido freqüentemente do aparecimento de sintomas no fruto, tornando o uso dessa fonte de resistência questionável em circunstâncias de grande amplitude de temperatura (Ultzen *et al.*, 1995).

Em 1994, Giordano *et al.* publicaram os resultados dos experimentos de campo conduzidos com diferentes cultivares de tomate visando avaliar a resistência desses genótipos contra tospovírus. No Distrito Federal, os resultados indicaram que em determinadas épocas do ano, a cultivar “Kada” apresentou, em média, apenas 10% de plantas infectadas, enquanto a cultivar “Santa Clara” apresentou, em média, mais de 50%. Um genótipo possuidor do gene Sw-5 apresentou apenas 3% de plantas infectadas, enquanto as cultivares “Jumbo” e “Ângela Gigante” apresentaram valores intermediários, ou

seja, 41% e 23%, respectivamente. Sugeriu-se que a baixa porcentagem de plantas infectadas observada em “Kada” possa ser decorrente de dois fatores, como o maior nível de resistência horizontal ou de campo, ou a existência de um mecanismo de escolha por parte das espécies de tripes responsáveis pela transmissão dos tospovírus (Giordano *et al.*, 1994). Em 1998, foi desenvolvida pela Embrapa Hortaliças e pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), a cultivar de tomate para processamento industrial Viradoro, resistente ao vira-cabeça do tomateiro (*Tospovirus*), à mancha-de-estenfilio (*Stemphylium solani*), à murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum* raça 1) e ao nematóide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), apresentando ainda alta produtividade (acima de 90 t/ha). A cultivar Viradoro foi selecionada a partir de cinco ciclos de autofecundação desenvolvidos após o quarto retrocruzamento sucessivo para a cultivar IPA-5 (possui o gene Sw-5), tendo como progenitor não recorrente a linhagem TSW-10, com resistência a tospovírus. O gene *Mi*, para resistência ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) provém da cultivar IPA-5. É indicada para plantio nas principais regiões produtoras de tomate do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, devendo-se evitar locais onde ocorrem geadas

Apesar do número de genes naturais de resistência ser pequeno para a maioria das espécies suscetíveis a esses vírus, várias estratégias para a obtenção de genótipos resistentes a vírus têm sido utilizadas. O uso de plantas transgênicas no controle de tospovírus representa uma valiosa ferramenta a ser empregada juntamente com as práticas convencionais conhecidas e tem sido usada largamente nos últimos anos, visando a obtenção de plantas importantes economicamente resistentes a vários vírus (Beachy *et al.*, 1990; Wilson, 1993; Resende, 1994).

As primeiras plantas transgênicas resistentes a tospovírus foram obtidas por Gielen *et al.* (1991) e por MacKenzie & Ellis (1992), demonstrando que plantas de fumo, expressando o gene da proteína N do TSWV, eram resistentes à infecção da espécie homóloga. Foram alcançados níveis de resistência semelhantes em folhas de fumo transformadas com um gene N não traduzível, ou seja, gene que não expressa a nucleoproteína N, indicando que a resistência é possivelmente mediada pelo RNA (de Haan *et al.*, 1992).

Posteriormente, Prins *et al.* (1995) observaram que plantas transgênicas de fumo contendo seqüências da nucleoproteína de três espécies de tospovírus (TSWV, TCSV e GRSV), apresentaram desde imunidade até suscetibilidade ao ataque dessas espécies de vírus. A resistência ao ataque de TSWV foi descrita em plantas de fumo contendo seqüências não traduzíveis da proteína não estrutural do RNA médio (NS<sub>M</sub>), proteína de movimento viral célula-célula (Prins *et al.*, 1997). Plantas transgênicas expressando outras partes do genoma viral não foram capazes de resistir à infecção, independentemente das seqüências terem sido derivadas de S, M ou de L RNAs ou de conterem seqüências internas ou terminais do genoma. Os experimentos realizados por Prins *et al.* (1996) demonstraram que somente seqüências derivadas do gene N (codificante da nucleoproteína viral) e do gene NS<sub>M</sub> do genoma do TSWV foram capazes de conferir resistência ao vírus em plantas transgênicas de fumo. Esses genes possivelmente interferem na transcrição ou tradução dos mRNAs virais, sugerindo um importante papel das proteínas N e NS<sub>M</sub> nos estágios iniciais da infecção.

Os RNAs defectivos interferentes (DIs) também foram relatados como indutores da resistência transgênica contra tospovírus (Resende, 1993). Neste caso, a proteção se caracterizou pelo significativo retardamento no aparecimento dos sintomas, assim como pela pronunciada atenuação dos danos causados pela infecção viral. O provável mecanismo envolvido neste tipo de proteção seria a interferência dos DIs na replicação do vírus.

Uma alternativa de resistência de plantas contra amplo espectro de tospovírus foi desenvolvida por Rudolph *et al.* (2003). Eles produziram plantas transgênicas de fumo (*N. benthamiana*) expressando um peptídeo contendo 29 aminoácidos fusionado com uma proteína carreadora, que interagiu fortemente com as nucleoproteínas das espécies TSWV, TCSV, GRSV e CSNV, causando resistência da planta contra tais espécies.

Considerando os resultados de pesquisa e os dados de avaliação de campo, a produção de plantas transgênicas com resistência a várias espécies de vírus constitui uma alternativa viável no controle de tospovírus. Além disso, o sistema transgênico possibilita o estudo das funções de proteínas estruturais e não-estruturais do vírus durante o processo de infecção.

## 11. Formas defectivas de tospovírus

Os tospovírus podem ser transmitidos mecanicamente de uma planta a outra em condições de laboratório. A prática de inoculações mecânicas repetidas de um mesmo inóculo em plantas hospedeiras é rotineira, o que pode induzir à formação de partículas de vírus defectivas. Nos tospovírus, já foram descritos dois tipos distintos de partículas defectivas, incluindo partículas virais que possuem o L RNA incompleto (DI RNA) e partículas virais morfologicamente defectivas (Ie, 1982; Resende *et al.*, 1991b e 1992).

Os RNAs defectivos interferentes (DIs) são partículas de tospovírus que possuem os três segmentos de RNA completos e segmentos incompletos do L RNA, onde 60 a 80% da parte central do RNA inicial foi perdida, mantendo-se as regiões terminais 5' e 3' do L RNA (Resende *et al.*, 1992; Inoue-Nagata *et al.*, 1998). Estes DIs RNAs são assim chamados pelo fato de serem preferencialmente replicados durante a infecção, interferindo na multiplicação do L RNA completo. Os DIs foram detectados em nucleocapsídeos purificados e em partículas completas do vírus purificado. A determinação da seqüência de vários DIs revelou que eles representavam ORFs com capacidade de codificação de proteínas, que foi comprovada pela detecção de proteínas truncadas de menor peso molecular e reações específicas com o anticorpo para a proteína L (Inoue-Nagata *et al.*, 1998).

Inoue-Nagata *et al.* (1997) relataram que a formação de DIs é influenciada por diversos fatores, incluindo o hospedeiro, a concentração do inóculo viral e a temperatura. Assim, o surgimento dos DIs é favorecido em elevadas concentrações de vírus no inóculo, acentuando-se com o crescimento das plantas em baixas temperaturas. Estes autores realizaram sucessivas inoculações mecânicas usando o vírus original (selvagem) como inóculo inicial e observaram DIs em *Capsicum annum*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana rustica*, ao passo que em *Emilia sonchifolia* nunca foram detectados DIs. A escolha do hospedeiro é fundamental quando se pretende estudar e manter as formas selvagens dos tospovírus.

Os tospovírus morfologicamente defectivos não possuem o envelope lipídico. Desta forma, a diagnose viral ocorre através de microscopia eletrônica de transmissão dos tecidos infectados mediante a observação do aparecimento

de estruturas densas agregadas (nucleocapsídeos). Com o decorrer da infecção viral, acontece um aumento do número de aglomerados densos, simultaneamente à diminuição do número de partículas (Ie, 1982; Verkleij & Peters, 1983; Resende *et al.*, 1991; Kitajima *et al.*, 1992). A capacidade desse aglomerado nucleoproteico em causar infecção sistêmica nas plantas continua, apesar de não serem mais transmissíveis pelo trips (Wijkamp, 1995). As partículas morfológicamente defectivas já foram relatadas em TSWV, INSV e WSMV, sugerindo ser um mecanismo comum às várias espécies de tospovírus (Lawson *et al.*, 1996). A hipótese mais provável do surgimento desses defectivos é a ocorrência de alterações no M RNA das partículas virais completas, especificamente no gene que codifica o precursor das glicoproteínas. Estas alterações podem culminar com a geração de partículas morfológicamente deficientes. Verkleij e Peters (1983) observaram uma diminuição do tamanho do M RNA original de cerca de 300 a 600 nucleotídeos. Resende *et al.* (1993) relataram que este tipo de alteração é variável, podendo haver mutações pontuais no precursor das glicoproteínas ou pequenas deleções no mesmo gene.

## **12. Mecanismos de defesa da planta contra o ataque de patógenos**

Toda a interação patógeno-hospedeiro pode ser vista como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência. De um lado, o hospedeiro em potencial procura se defender do patógeno através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, e de outro lado, o patógeno utiliza suas armas químicas para atacar o hospedeiro em potencial. A interação patógeno-hospedeiro é um sistema único, dependente do patógeno, do hospedeiro e do ambiente. A resistência acontece quando o hospedeiro é o vencedor e a doença não ocorre, ao passo que a suscetibilidade indica o patógeno como o vencedor, normalmente se visualizando o aparecimento de sintomas (Pascholati & Leite, 1995; del Pozo & Lam, 2003).

O estabelecimento de uma doença constitui-se em exceção pois, em geral, observa-se três situações principais: 1) a planta não oferece condições fisiológicas e nutricionais (nicho) necessárias para o ataque e desenvolvimento de um patógeno potencial, tornando-a não-hospedeira; 2) a planta possui barreiras estruturais pré-formadas ou componentes tóxicos, restringindo a espécies de patógenos especializados a capacidade de infecção com sucesso; e 3) após o reconhecimento de um ataque do patógeno, os mecanismos de defesa são ativados e a invasão permanece localizada (Agrios, 1997). Todos esses três tipos de interações são chamados incompatíveis (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

A invasão de um patógeno na planta com sucesso e a doença acontecem quando as defesas da planta pré-formadas são inapropriadas, ou seja, a planta não detecta o patógeno ou as respostas de defesa ativadas são ineficazes. Esses tipos de interações são denominados compatíveis (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

A co-evolução de plantas e microorganismos tem gerado o aumento da diversidade dos sinais e respostas provocados pelas interações. Os microorganismos podem elicitar vários tipos de resposta na hospedeira, tais como: com aceitável tolerância, com reconhecimento tardio e defesas moderadamente efetivas, resultando em doença na maioria das vezes; ou com uma forte e rápida resposta de defesa, o que bloqueia infecções futuras (Dixon & Lamb, 1990; Keen, 1990; Long & Staskawicz, 1993). Esta última forma de resistência é conhecida como resistência raça-específica, gene-a-gene ou

reação de hipersensibilidade. A ativação deste tipo de resistência depende do reconhecimento específico do produto do gene de avirulência do patógeno pela planta hospedeira (gene *R*) (Keen, 1990) e resulta na ativação localizada da morte celular programada. Nos últimos anos, têm sido identificados e caracterizados numerosos genes de planta individuais que controlam a resistência gene-a-gene, sendo conhecidos como genes de resistência (*R*). O gene do patógeno é chamado de gene de avirulência (*avr*) se a sua expressão causar a produção de sinais que desencadeiam uma resposta de defesa forte na planta, após interagir com o gene *R* da planta, ou seja, é o elicitador da reação de hipersensibilidade (Keen, 1990; de Wit, 1992; Bent, 1996).

### **12.1. Reação de hipersensibilidade (RH)**

Em algumas interações entre patógeno e hospedeiro acontece o fenômeno da hipersensibilidade, considerado um dos mecanismos de defesa mais eficiente contra o ataque de patógenos (Karrer *et al.*, 1998). A reação de hipersensibilidade (RH) é um vasto sistema de defesa ativo que ocorre na maioria (se não em todas) as plantas superiores em resposta aos patógenos (Keen, 1990). É considerada uma resposta celular extrema por parte da planta, podendo levar a um alto grau de resistência à doença.

A reação de hipersensibilidade foi primeiramente descrita em plantas por Chester (1933). A RH causa a morte repentina de um número limitado de células do hospedeiro que circundam os sítios de infecção. Estas células necróticas da planta parecem não ser responsáveis por si pela restrição no desenvolvimento do patógeno, mas devem funcionar atuando como reservatórios para a acumulação de fitoalexinas e promovendo elicitores secundários, que por sua vez devem estimular a defesa nas células vizinhas (Keen, 1990). Este tipo de reação provoca a parada do crescimento e do desenvolvimento do patógeno nos tecidos da planta, sendo considerado como uma resposta de defesa induzida. Nas doenças causadas por vírus, a RH resulta na formação das chamadas lesões locais necróticas, onde as partículas virais podem sobreviver por tempo determinado e em baixas concentrações, porém sem possibilidade de movimentação para fora da área infectada. A RH representa um "suicídio" de algumas poucas células em benefício da sobrevivência das demais (Pascholati & Leite, 1995).

O reconhecimento de um patógeno por uma planta é seguido por uma série de mudanças bioquímicas complexas, que ocorrem próximo ao sítio de infecção, incluindo a acumulação de fitoalexinas; síntese de enzimas prejudiciais ao patógeno (quitinases e glucanases); enrijecimento da parede celular das células infectadas (Dixon & Lamb, 1990; Dixon *et al.*, 1994), devido à deposição de calose e lignina; a acumulação de proteínas relacionadas com a patogenicidade (PR); e a rápida morte das células das plantas, formando lesões necróticas (Dixon & Harrison, 1990). Esta morte celular localizada apresenta similaridades com a apoptose ou morte celular programada, encontrada em células animais (Mittler *et al.*, 1995; Ryerson *et al.*, 1996). Fortes evidências sugerem que a regulação da RH é igualmente complexa, envolvendo a participação de moléculas transdutoras de sinais, como espécies de oxigênio reativo (superóxido), fluxo de íons  $Ca^{+2}$  e outros, proteínas G, produção ou liberação de ácidos salicílico e jasmônico, cascata de fosforilação de proteínas, ativação de fatores de transcrição e reciclagem de proteínas através do sistema poliubiquitina (Dixon *et al.*, 1994; Hammond-Kosack & Jones, 1996; Dangl *et al.*, 1996).

A RH pode apresentar fenótipos diferentes na planta de acordo com as condições ambientais, podendo ser atenuado em ambientes com alta umidade. O sintoma pode ser visualizado em uma única célula ou espalhado em áreas necróticas, acompanhando a colonização do patógeno (Holub *et al.*, 1994). O mecanismo bioquímico que melhor explica a RH é a morte celular programada.

## **12.2. Morte celular programada**

A morte celular programada (“programmed cell death” – PCD) ou apoptose é um processo básico controlado geneticamente que funciona durante o desenvolvimento dos organismos multicelulares e em resposta aos estresses biótico e abiótico (Raff, 1998). A PCD permite eliminar células infectadas, danificadas ou redundantes. Em mamíferos, a apoptose é reconhecida como um fenômeno ubiquitoso com características morfológicas peculiares, incluindo condensação do núcleo e do citoplasma, clivagem do DNA em pequenos fragmentos de 180 pb (“DNA laddering”) e marcação da superfície das células mortas quando ingeridas por fagócitos (Kerr *et al.*, 1972; Chichkova *et al.*, 2004). No nível molecular, existem duas vias metabólicas

principais para a PCD, uma envolvendo a interação do receptor com seu ligante, e a outra dependente da participação da mitocôndria. A liberação de um grande número de fatores (citocromo c) a partir do espaço intermembrânico da mitocôndria é regulada através de membros anti-apoptóticos e pró-apoptóticos da família dos genes *Bcl-2* (Green, 1998; Adrain & Martin, 2001; Kaufmann & Hengartner, 2001). O resultado final de ambas as vias metabólicas conduz à ativação das caspases, uma família de proteases de cisteínas, conservadas evolutivamente desde os nematóides até os seres humanos. As caspases são ativadas a partir de precursores dormentes durante o curso da apoptose, executando clivagens após resíduos de asparagina específicos, em um conjunto limitado de substratos proteicos celulares chaves. As caspases estão entre as proteases mais específicas, usualmente efetuando não mais do que uma ou duas clivagens por substrato de proteína introduzido. As fragmentações de proteínas mediadas por caspases levam à destruição celular (Chichkova *et al.*, 2004).

Em plantas, muitos tecidos ou órgãos executam a PCD como parte do seu desenvolvimento normal, como durante a senescência, ou em resposta a patógenos e estresses ambientais (Greenberg, 1996). Apesar do mecanismo da PCD em plantas não estar completamente elucidado, muitas similaridades morfológicas e bioquímicas entre PCD em animais e plantas têm sido descritas em diferentes sistemas experimentais, tais como: condensação e encolhimento do núcleo e citoplasma, "DNA laddering", e liberação do citocromo c a partir da mitocôndria (Danon *et al.*, 2000; Balk & Leaver, 2001; Lam *et al.*, 2001; Hoeberichts & Woltering, 2003; Lam, 2004).

É controversa a existência de caspases em plantas. Apesar de nenhum homólogo à enzima caspase animal ter sido identificado em plantas até hoje, fortes evidências indiretas sugerem a existência da atividade do tipo caspase em plantas e seu envolvimento funcional na morte celular programada (Woltering *et al.* 2002). Os inibidores de caspase têm sido usados freqüentemente para demonstrar a participação e a caracterização da atividade da caspase no processo de morte celular em diferentes sistemas. Existem diversos tipos de inibidores de caspases, como os sintéticos, os celulares endógenos e os virais fisiológicos. Dentre os inibidores de caspases animais que afetaram o desenvolvimento da PCD em plantas, citam-se os inibidores da

caspase-1 e caspase-3, chamados Ac-YVAD-cmk e Ac-DEVD-CHO, respectivamente, que atenuaram a RH induzida por *Tobacco mosaic virus* (TMV) e por bactéria em folhas de fumo (del Pozo & Lam, 1998). Esses mesmos inibidores descritos acima reduziram a morte de células de fumo induzidas por isopentiladenosina (Mlejnek & Prochazka, 2002), e foram eficientes na inibição da morte celular durante a apoptose induzida por menadion em protoplastos de fumo (Sun *et al.*, 1999). Em culturas de suspensão de *Arabidopsis*, a morte celular induzida por óxido nítrico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi inibida pelo inibidor de caspase-1 (Clarke *et al.*, 2000).

As proteínas anti-apoptóticas de baculovírus p35 e IAP, conhecidas como inibidores de caspases animais, mostraram-se eficientes na prevenção da morte celular induzida por infecções virais, fúngicas e bacterianas. Em tecidos de milho, o co-cultivo com *Agrobacterium* spp. resultou em um processo semelhante à apoptose, que pôde ser revertido por p35 e IAP (Hansen, 2000). Em outro experimento, plantas transgênicas de fumo expressando o gene de baculovírus Op-IAP adquiriram resistência a vários fungos necrotróficos e ao TSWV (Dickman *et al.*, 2002), enquanto aquelas que expressaram p35 mostraram inibição parcial da RH induzida por bactéria e vírus (del Pozo & Lam, 2003).

Finalmente, foi identificado no genoma de *Arabidopsis*, as metacaspases, uma família de proteínas distantemente relacionadas do tipo caspase (“caspase-like”) (Uren *et al.*, 2000). No entanto, a existência de atividade proteolítica específica da caspase nessas metacaspases, assim como seu envolvimento durante a PCD em plantas, precisam ser investigados.

### 12.3. Teoria Gene-a-Gene

Esta teoria foi formulada pelo pesquisador americano Harold Flor em 1947, usando o patossistema linho-*Melampsora lini*. Flor demonstrou a existência de uma relação de um-a-um entre genes de ataque e de defesa, respectivamente, no patógeno e no hospedeiro. Os resultados dos seus experimentos originaram a chamada hipótese gene-a-gene ou hipótese de Flor.

Atualmente, o modelo usado para explicar a relação gene-a-gene sugere a existência de uma interação do tipo receptor-elicitor, na qual uma molécula elicitora produzida pelo patógeno reage especificamente com uma proteína

receptora sintetizada pelo gene de resistência do hospedeiro. Esta molécula elicitora seria produzida por um gene específico de avirulência do patógeno. A reação entre elicitor e receptor desencadearia uma complexa reação no sítio de infecção, resultando em uma reação incompatível (ausência de doença), onde a infecção e a colonização do patógeno no tecido hospedeiro seria muito limitada. Entretanto, se o patógeno possuir um gene de virulência, ele produzirá uma molécula que não será reconhecida pela molécula receptora da planta hospedeira e, como consequência, não reagirá à infecção, originando uma reação compatível (presença de doença). Por outro lado, caso a planta contenha um gene de suscetibilidade e não de resistência, ela será incapaz de produzir moléculas que acusem a presença do patógeno, independentemente do patógeno conter gene de avirulência ou gene de virulência. Uma única planta é capaz de possuir muitos genes *R*, assim como o patógeno pode conter vários genes *avr* (Bent, 1996).

Este modelo discutido ainda é hipotético, apesar de já ter sido confirmado para os patossistemas *Cladosporium fulvum*-tomate e *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*-soja. No primeiro caso, o produto do gene de avirulência *avr9* é uma proteína que adquire capacidade elicitora quando ela é clivada em um peptídeo menor que 28 aminoácidos. Este peptídeo é responsável pela necrose das células do tecido das plantas do tomate contendo o gene de resistência *Cf-9*. No segundo caso, o produto do gene de avirulência *avrD* de *P. s.* pv. *glycinea* não é uma substância elicitora, mas participa da síntese de uma família de substâncias elicitoras chamadas siringolinas, que provocam reação de hipersensibilidade em cultivares de soja contendo o gene de resistência *RPG4* (Camargo, 1995).

Outro exemplo de proteínas elicitoras de RH são as elicitinas, proteínas extracelulares que ocorrem em espécies de fungos oomicetos, como *Phytophthora* e *Pythium* (Ponchet *et al.*, 1999). As elicitinas foram primeiramente caracterizadas com base na sua habilidade de induzir RH quando infiltradas em plantas de fumo. Apesar de diferentes elicitinas variarem em relação à atividade indutora de RH, é conhecido que a maioria das espécies de fumo respondem a essas proteínas. Elas também induzem RH em poucas espécies de *Raphanus* e *Brassica*. Deste modo, elas são determinantes do círculo de hospedeiras para seleção de interações planta-*Phytophthora*,

funcionando como genes de avirulência espécie-específico (Kamoun, 2001; Kamoun *et al.*, 1997; 1998; 1999). As análises das seqüências das proteínas indicaram que as elicinas representam uma grande família de proteínas com pelo menos cinco classes diferentes (Kamoun *et al.*, 1997; Ponchet *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, a teoria gene-a-gene tem recebido enorme suporte experimental através da identificação e caracterização funcional dos genes *Avr* e *R* de vários patossistemas. Um grande número de genes *Avr* provenientes de fungos, bactérias e vírus tem mostrado que codificam proteínas elicitoras. Este fato foi demonstrado diretamente através da infiltração de proteínas *Avr* em folhas de plantas ou indiretamente através da expressão de genes *Avr* em células de plantas, que apresentavam o correspondente gene *R* (Culver & Dawson, 1991; de Wit, 1995; Alfano & Collmer, 1996; Knogge, 1996; Bonas & van den Ackerveken, 1997). Um característica interessante é a ocorrência de domínios estruturais similares entre os produtos dos genes *R*, sugerindo a existência de mecanismos conservados de reconhecimento do patógeno e de sinalização das respostas de defesa no reino vegetal (Dangl, 1995; Staskawicz *et al.*, 1995; Bent, 1996; Hammond-Kosack & Jones, 1997). Além disso, os mecanismos de defesa celular induzidos pelo patógeno das plantas compartilham algumas analogias com as respostas imunológicas dos vertebrados e insetos (Baker *et al.*, 1997).

### **13. Vetores de expressão de genes em plantas**

A expressão de genes heterólogos em plantas tornou-se uma ferramenta importante da biologia molecular. A transferência estável de genes para plantas pode ser obtida via transformação genética e cultura de tecidos ou através da transfecção com vírus. Os vários tipos de vetores virais representam um sistema muito mais simples e rápido de expressão de genes heterólogos. Além disso, este processo evita problemas como o local de inserção do gene em regiões inadequadas e variações somaclonais (Donson *et al.*, 1991).

O primeiro vetor de expressão viral produzido foi o *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), um vírus com DNA fita dupla, expressando o gene diidrofolato redutase (*DHFR*) e genes metalotionen II (Brisson *et al.*, 1984; Lefebvre *et al.*, 1987). Entretanto, o uso desse vírus como vetor de expressão mostrou-se

ineficaz, devido ao tamanho limite da seqüência introduzida para que haja o empacotamento do vírus (Brisson *et al.*, 1984).

Os geminivírus, compostos por fita simples de DNA, também têm sido usados para a expressão de genes heterólogos em plantas, através da substituição do gene da proteína da capa pelo gene de interesse. Os genomas do *Cassava latent virus* e do *Tomato golden mosaic virus* foram modificados da forma descrita, para expressar os genes cloranfenicol acetiltransferase (CAT), neomicina fosfotransferase (NPT) e GUS. O problema desse vírus como vetor de expressão reside no fato de que se o gene a ser inserido apresentar um comprimento mais longo do que o gene da capa proteica, ocorrem deleções nas seqüências incorporadas e regeneração de moléculas com o comprimento do vírus selvagem (Elmer & Rogers, 1990; Hayes *et al.*, 1988; 1989; Ward *et al.*, 1988).

A estratégia de substituição de genes também tem sido empregada para a produção de vetores a partir de vírus de RNA (French *et al.*, 1986; Takamatsu *et al.*, 1987; Dawson *et al.*, 1988; Joshi *et al.*, 1990). Estes vetores têm permitido a expressão dos genes introduzidos, mas seu uso tem sido restrito pelo fato deles não serem capazes de infectar plantas intactas, ou serem incapazes de estabelecer infecções sistêmicas na planta. Dawson *et al.* (1989) desenvolveram o vetor TMV como uma alternativa à substituição de genes. A estratégia envolveu a inserção do gene CAT, adicionado a uma cópia duplicada do promotor sub-genômico do mRNA da proteína da capa, na extremidade 3' do gene da proteína da capa, ou mais efetivamente para a expressão do CAT, entre o gene da proteína de 30 kDa e o gene da proteína da capa. Entretanto, a seqüência inserida foi perdida por recombinação homóloga entre as regiões duplicadas dos genomas virais que se espalharam sistemicamente na planta. Então, foi criada uma modificação desta estratégia visando reduzir a recombinação homóloga. Foi adicionado o gene da proteína da capa e a seqüência promotora de um outro tobamovírus, o *Odontoglossum ringspot virus*, dentro da seqüência do TMV (Donson *et al.*, 1991). Esta estratégia permitiu a propagação estável do gene *DHFR* através de várias passagens do TMV pela planta. No entanto, a expressão do gene NPT, mais longo que o gene *DHFR*, mostrou-se instável durante o movimento sistêmico do vírus na planta.

O vetor viral de plantas PVX, desenvolvido por Chapman *et al.* (1992), surgiu como uma alternativa eficiente de expressão de genes heterólogos. O *Potato virus X* (PVX) é a espécie-tipo da família *Potexvirus* (Koenig & Leseman, 1989) e seu genoma é formado por uma fita simples de RNA, com adição de cap na extremidade 5' (Sonenberg *et al.*, 1978) e cauda poliadenilada na extremidade 3' (Morozov *et al.*, 1981). A sequência nucleotídica completa do seu genoma já foi determinada para várias espécies, permitindo que fosse elucidada sua estratégia de codificação genômica (Huisman *et al.*, 1988; Skryabin *et al.*, 1988; Orman *et al.*, 1990). O genoma do PVX possui senso positivo e cinco fases de leitura aberta (ORFs). A primeira ORF (presente na extremidade 5') codifica uma proteína de 166 kDa, envolvida na replicação viral (Huisman *et al.*, 1988). Esta ORF é seguida por três ORFs que se sobrepõem parcialmente, conhecida como "triple-gene block", codificando proteínas de 25, 12 e 8 kDa, respectivamente. A função dos genes da "triple-gene block" é relacionada com o movimento do vírus célula a célula e transporte vascular (<http://www.bspp.org.uk/icpp98/>). A quinta ORF codifica a capa proteica.

Considerando-se as características de um vetor de expressão em plantas, muitas características do PVX adaptam-se perfeitamente a este propósito: 1) PVX tem uma ampla gama de hospedeiros; 2) ele pode translocar de célula a célula utilizando uma proteína codificada pelo seu genoma; 3) apresenta uma rápida disseminação sistêmica em plantas infectadas; 4) a infecção de PVX pode se manter indefinidamente na planta; 5) replica independentemente na célula em altas taxas; 6) esta replicação resulta em uma rápida expressão de proteínas no citoplasma; 7) o genoma de PVX pode ser manipulado na forma de DNA e transcritos infecciosos podem ser produzidos "in vitro" (Chapman *et al.*, 1992; Baulcombe *et al.*, 1995); 8) as versões pgR106 e pgR107 que contêm o promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* clonado em vetor binário permite a agro-inoculação e elimina a etapa de síntese de transcritos infecciosos.

## OBJETIVOS

O objetivo geral da tese foi a determinação e análise das seqüências dos precursores das glicoproteínas de duas espécies de tospovírus com ocorrência no Brasil (TCSV e GRSV) e a identificação do gene de avirulência do TSWV que interage com o gene de resistência *Tsw* presente em *Capsicum chinense* 'PI159236'.

Objetivos específicos do Capítulo 2:

- ✓ Clonar e seqüenciar a região intergênica do M RNA, a região 3' não traduzida do M RNA e o gene precursor das glicoproteínas do TCSV e GRSV.
- ✓ Comparar o grau de identidade das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dos precursores das glicoproteínas de diversas espécies de tospovírus.
- ✓ Determinar a ocorrência de domínios conservados nas glicoproteínas G1 e G2 das espécies estudadas.
- ✓ Determinar a estrutura secundária e a topologia das proteínas G1 e G2 das espécies estudadas.
- ✓ Executar análises filogenéticas de várias espécies de tospovírus baseadas nas seqüência das glicoproteínas e das regiões intergênicas do M RNA.

Objetivos específicos do Capítulo 3:

- ✓ Clonar os genes N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> do TSWV no vetor de expressão binário pgR107 baseado em PVX e *Agrobacterium tumefaciens*.
- ✓ Agro-inoculação dos vetores de expressão recombinantes em *C. chinense* "PI159236" e outras plantas, monitoramento dos sintomas e análise da expressão das proteínas nas plantas inoculadas.

## CAPÍTULO 2

### **Análise da seqüência das glicoproteínas de *Tomato chlorotic spot virus* e *Groundnut ringspot virus* e comparação com outros tospovírus**

Fernanda Antinolfi Lovato<sup>1</sup>, Tatsuya Nagata<sup>3</sup>, Renato de Oliveira Resende<sup>1</sup>, Antônio Carlos de Ávila<sup>2</sup> e Alice Kazuko Inoue-Nagata<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Católica de Brasília, DF, Brasil.

**Resumo.** Os tospovírus *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) causam severos prejuízos econômicos em várias hortaliças no Brasil. A seqüência de nucleotídeos do gene que codifica o precursor das glicoproteínas dessas duas espécies de tospovírus ainda não havia sido determinada. Neste estudo, o genoma da região 3' do M RNA (4,0 kb) do TCSV e do GRSV foi analisado após clonagem e seqüenciamento dos fragmentos. As seqüências foram compiladas com aquelas pertencentes à região 5' do M RNA (gene NS<sub>M</sub> e região 5' não traduzida) dos mesmos isolados. O M RNA do TCSV é formado por 4882 nucleotídeos, enquanto o M RNA do GRSV é formado por 4855 nucleotídeos. Ambos os M RNAs possuem duas fases de leitura aberta (ORF ou "open reading frame") em arranjo ambisenso. A ORF no sentido viral complementar do M RNA codifica o precursor das glicoproteínas virais G1 e G2 do TCSV (128,46 kDa) e o precursor das glicoproteínas do GRSV (128,16 kDa). A comparação da seqüência de aminoácidos do precursor das glicoproteínas do TCSV e GRSV com as das demais espécies de tospovírus mostraram maior identidade com a espécie-tipo *Tomato spotted wilt virus* (81 e 79%, respectivamente). A comparação da seqüência de aminoácidos do precursor das glicoproteínas entre TCSV e GRSV revelou alta identidade (92%). Entretanto, a identidade da seqüência de nucleotídeos da região intergênica do M RNA entre TCSV e GRSV mostrou ser de apenas 78%. As análises filogenéticas foram realizadas baseando-se no precursor das glicoproteínas e na região intergênica do M RNA dos tospovírus, permitindo que fossem discutidos parâmetros da classificação taxonômica de espécies em tospovírus.

Este trabalho foi aceito para publicação no periódico *Virus Genes* com algumas modificações. Lovato, F. A.; Nagata, T.; Resende, R. O.; de Ávila, A. C.; Inoue-Nagata, A. K. Sequence analysis of the glycoproteins of *Tomato chlorotic spot virus* and *Groundnut ringspot virus* and comparison with other tospoviruses. *Virus Genes*, 29: 3, 2004.

## Introdução

Os tospovírus encontram-se disseminados pelo mundo causando severos prejuízos econômicos em várias culturas incluindo alface, amendoim, batata, ervilha, fumo, pimenta, pimentão, tomate e plantas ornamentais (Peters, 1998). O gênero *Tospovirus* é o único membro da família *Bunyaviridae* que infecta plantas e atualmente é constituído por treze espécies diferentes (van Regenmortel *et al.*, 2000; Cortez *et al.*, 2002). Os tospovírus são formados por partículas isométricas, medindo de 80 a 110 nm (Kitajima *et al.*, 1992), e são transmitidos por tripes de maneira circulativa e propagativa (Sakimura, 1962; Ullman *et al.*, 1993; Wijkamp *et al.*, 1993). O genoma dos tospovírus é composto por três segmentos lineares de RNA envolvidos pela nucleoproteína (N), formando um complexo ribonucleoproteico (Mohamed *et al.*, 1973; Tas *et al.*, 1977), juntamente com algumas cópias da polimerase viral (L) (10-20 cópias por partícula) (van Poelwijk *et al.*, 1993). Esta estrutura é circundada por um envelope formado por bicamada lipídica, onde estão inseridas as projeções das glicoproteínas G1 e G2. O genoma contém cinco fases de leitura aberta ou ORF ("open reading frame") em uma estratégia de codificação negativa ou ambisenso. O segmento L RNA apresenta somente uma ORF com polaridade negativa e codifica a polimerase viral (L) (de Haan *et al.*, 1991; van Poelwijk *et al.*, 1997). O S RNA possui duas ORFs em estratégia ambisenso. A ORF no sentido viral do S RNA codifica a proteína não estrutural NS<sub>S</sub> enquanto a ORF no sentido viral complementar codifica a nucleoproteína (N) (de Haan *et al.*, 1990; Kormelink *et al.*, 1991). O M RNA também possui duas ORFs com estratégia ambisenso. A ORF no sentido viral do M RNA codifica a proteína não estrutural de movimento do tipo célula-a-célula NS<sub>M</sub> e a ORF no sentido viral complementar do M RNA codifica o precursor das glicoproteínas G1 e G2 (Kormelink *et al.*, 1992; Law *et al.*, 1992; Storms, 1998).

Baseando-se nas seqüências conservadas dos genes da polimerase e dos precursores das glicoproteínas virais, de Haan *et al.* (1991) e Kormelink *et al.* (1992) discutiram que os tospovírus possam ter divergido evolutivamente a partir de um ancestral bunyavírus. Tem sido sugerido que as glicoproteínas estão envolvidas na aquisição da partícula viral pelo tripe e no processo de replicação dentro do corpo do inseto, mas não assumem função essencial para a infecção sistêmica do vírus na planta. De fato, um isolado de tospovírus que tenha perdido suas glicoproteínas

após inoculações mecânicas repetidas, não pode mais ser transmitido pelo tripses (le, 1982; Verkleij & Peters, 1983; Resende *et al.*, 1991). A entrada do vírus no vetor é provavelmente regulada por interações das glicoproteínas virais com receptores presentes nas células do intestino médio do inseto vetor (Kikkert, 1999; Nagata *et al.*, 2000).

As espécies de tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) apresentam grande ocorrência no Brasil e Argentina (de Ávila *et al.*, 1990; 1993a; Dewey *et al.*, 1995; 1996). Atualmente, a seqüência de nucleotídeos completa do gene precursor das glicoproteínas está disponível para 5 das 13 espécies de tospovírus estabelecidas pelo Comitê Internacional em Taxonomia de Virus (ICTV), isto é: TSWV, *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Peanut bud necrosis virus* (PBNV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) e para a espécie tentativa *Gloxinia tospovirus*.

Neste artigo, a região 3' do M RNA, incluindo o gene precursor das glicoproteínas, a região intergênica (IGR) e a região 3' não traduzida (UTR) do M RNA do TCSV e do GRSV, foi seqüenciada e comparada com outras espécies de tospovírus. Além disso, foram construídas árvores filogenéticas baseadas nessas comparações. A elucidação da seqüência completa do precursor das glicoproteínas do TCSV e GRSV será fundamental para promover estudos de interação entre glicoproteínas e receptores presentes no corpo do tripses, para discutir alguns aspectos evolucionários envolvidos na classificação taxonômica dos tospovírus, assim como para contribuir com estudos relacionados à função das glicoproteínas.

## Materiais e métodos

### Manutenção dos isolados virais e plantas

As espécies de tospovírus TCSV (de Ávila *et al.*, 1990) e GRSV (de Ávila *et al.*, 1990) usadas neste trabalho foram mantidas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e propagadas em *Nicotiana rustica* ou *Nicotiana benthamiana* através de inoculação mecânica do extrato foliar, usando-se tampão fosfato 0,05M e tampão sulfito de sódio 0,01M, pH 7,0, em condições de casa de vegetação.

### Purificação dos nucleocapsídeos e do RNA viral

Os nucleocapsídeos virais foram parcialmente purificados a partir de folhas de *N. rustica* e *N. benthamiana* infectadas sistemicamente com TCSV e GRSV, conforme descrito por de Ávila *et al.* (1990), com algumas modificações. As folhas infectadas (50 g) foram maceradas em tampão de extração (Tris-HCl 0,1M;  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0,01M; EDTA 0,01M, pH 8,0) e filtradas em fralda. O extrato foi centrifugado a 3.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido à alta centrifugação a 25.000 g por 30 minutos. O precipitado formado foi ressuscitado em tampão de ressuspensão (Tris-HCl 0,01M;  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0,01M; EDTA 0,01M, pH 7,9), agitado gentilmente por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante (25 ml) foi centrifugado em colchão de sacarose 30% a 40.000 g por 1 hora. Finalmente, o precipitado formado foi ressuscitado em 500  $\mu\text{l}$  de tampão citrato ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ , pH 6,0) e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O RNA viral foi extraído usando-se o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante.

### Síntese do cDNA e PCR

O cDNA do gene precursor das glicoproteínas do TCSV e do GRSV foi sintetizado a partir do RNA viral purificado usando-se um oligonucleotídeo baseado numa região conservada presente em todas as extremidades 3' dos segmentos de RNA dos tospovírus (MRNA18 – 5'AGAGCAATCAGTGCAAAC 3'). Para a reação de retrotranscrição, foi usada a enzima Superscript II (Invitrogen) e 100-500 ng do RNA viral purificado, de acordo com as especificações do fabricante. A reação foi mantida a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora e em seguida foi aquecida a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

Finalmente, a reação foi tratada com 40 U de Ribonuclease H (Invitrogen) a 37°C durante 20 minutos.

O cDNA obtido foi usado como molde para a “polymerase chain reaction” (PCR). Foi sintetizado um segundo oligonucleotídeo para a amplificação do gene precursor das glicoproteínas, da região intergênica do M RNA e da região 3' não traduzida do M RNA, anelando numa porção conservada da extremidade 3' do gene que codifica a proteína NS<sub>M</sub>, desenhado a partir das seqüências do TCSV, AF213674 e do GRSV, AF213673 (NSM14 – 5'ATTGAAGCMTGCAA3'). Para a reação de PCR, foram misturados em tubos de microcentrífuga 2 µl do cDNA com 5 µl do tampão da *Taq* DNA polimerase 10X (Amersham Biosciences), 5 µl de dNTP 2,5 mM, 0,8 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 100 ng do oligonucleotídeo MRNA18, 100 ng do oligonucleotídeo NSM14, 2,5 U da *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences) e água para um volume final de reação de 50 µl. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Mastercycler (Eppendorf) a foram iniciadas com a temperatura de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 4 minutos e pela temperatura de extensão final de 72°C por 7 minutos.

#### Clonagem da região 3' do M RNA e seqüenciamento dos nucleotídeos

Os fragmentos amplificados por PCR (4,0 kb) foram separados em gel de agarose 1%, purificados usando-se Sephaglass Band Prep Kit (Amersham Biosciences), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os produtos da PCR eluídos foram ligados no vetor pCR2.1 TOPO-TA (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. O DNA dos fragmentos ligados ao vetor foi usado para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* XL-1 Blue através de choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). Após a seleção dos clones recombinantes, os insertos foram seqüenciados no ABI 3100 (Applied Biosystems), usando-se oligonucleotídeos universais e internos (Tabela 1).

## Análise das seqüências

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram compiladas e analisadas usando-se o método ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>), do Instituto de Bioinformática Europeu e o programa DNASIS versão 2.6 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd). As massas moleculares das proteínas foram preditas a partir das seqüências de aminoácidos deduzidas usando-se o programa Amino Acid Composition, do Network Protein Sequence Analysis – NPSA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa\\_compo.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_compo.html)). As buscas por motivos e domínios de proteínas foram executadas através dos programas Prosite (Bairoch *et al.*, 1997) e SMART (Schultz *et al.*, 1998; 2000). As predições da estrutura secundária das proteínas foram realizadas usando-se o programa do NPSA para o método GOR IV (Garnier *et al.*, 1996). As seqüências dos fragmentos dos genes precursores das glicoproteínas foram obtidas a partir de três clones independentes.

Os múltiplos alinhamentos das seqüências de aminoácidos gerados pelo método ClustalW foram usados como entrada de dados para as análises filogenéticas usando-se o programa MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). As árvores filogenéticas foram construídas usando-se o método da máxima parsimônia com programa de pesquisa “branch & bound” e análise “bootstrap” com 1000 repetições.

As seqüências correspondentes às regiões 3’ do M RNA do TCSV e do GRSV descritas neste trabalho foram depositadas no banco de dados de seqüências do GenBank com os números de acesso AY574054 e AY574055, respectivamente.

## Resultados

### Seqüenciamento da região 3' do M RNA do TCSV e do GRSV

Com o objetivo de amplificar o gene precursor das glicoproteínas completo, a região intergênica do M RNA e a região 3' não traduzida do M RNA, foram desenhados oligonucleotídeos baseados numa seqüência interna do gene NS<sub>M</sub> e numa seqüência conservada presente na extremidade 3' dos tospovírus. A amplificação por PCR usando esses oligonucleotídeos resultou na obtenção de um fragmento de DNA esperado de 4,0 kb e outros fragmentos de DNA com comprimentos menores (dados não mostrados). O fragmento de DNA desejado foi excisado e eluído do gel de agarose, clonado e seqüenciado.

As seqüências foram compiladas com aquelas disponíveis da região 5' do M RNA dos mesmos isolados (AF213674 para o TCSV BR-03 e AF213673 para o GRSV SA-05), completando o seqüenciamento do M RNA dos dois isolados. O M RNA do TCSV apresentou 4882 nucleotídeos de comprimento, mostrando um arranjo de codificação ambisenso. A ORF da fita viral complementar do M RNA do TCSV iniciou com o códon AUG na posição 4795 e terminou com o códon UAG na posição 1369 (numerada a partir da extremidade 5' do RNA viral), codificando o gene precursor das glicoproteínas G1 e G2. Esta ORF continha 3426 nucleotídeos codificando 1141 aminoácidos, com uma massa molecular total predita de 128,46 kDa (Tabela 2).

O M RNA do GRSV apresentou 4855 nucleotídeos de comprimento. A ORF da fita viral complementar do M RNA do GRSV iniciou com o códon AUG na posição 4771 e terminou com o códon UAG na posição 1354 (numerada a partir da extremidade 5' do RNA viral). Esta ORF continha 3417 nucleotídeos e 1138 aminoácidos, codificando o gene precursor das glicoproteínas G1 e G2, com uma massa molecular total predita de 128,16 kDa (Tabela 2).

A extremidade 3' do M RNA do TCSV e do GRSV foi formada por uma região 3' não traduzida de 87 e 84 nucleotídeos, respectivamente (Tabela 2). Quando essas seqüências foram comparadas, a identidade de nucleotídeos foi de 97%. Os primeiros nove nucleotídeos da extremidade 3' terminal foram altamente conservados entre TSWV, TCSV, GRSV, INSV, GBNV, WSMV e IYSV (dados não mostrados).

### Similaridade e topologia dos precursores das glicoproteínas entre tospovírus

A comparação da seqüência de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas do TCSV e do GRSV com as demais seqüências de tospovírus disponíveis no banco de dados, demonstrou maior identidade com a espécie-tipo TSWV (81% e 79%, respectivamente) e menor identidade com as espécies INSV, GBNV, WSMV e IYSV (Tabela 3). Quando as seqüências de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas do TCSV e do GRSV foram comparadas, foi observada alta identidade (92%).

A análise dos domínios dos precursores das glicoproteínas, executada pelo programa SMART, mostrou a presença de uma seqüência peptídeo-sinal com um sítio de clivagem predito no aminoácido de resíduo 36 a partir da extremidade amino terminal, assim como cinco domínios transmembrânicos, em ambas as espécies. Além disso, foram preditos seis sítios de *N*-glicosilação nos precursores das glicoproteínas do TCSV e do GRSV, localizados em posições similares dentro das respectivas proteínas (Figura 1).

A análise dos motivos das proteínas, executada pelo programa Prosite, mostrou a presença do motivo RGD (Arg-Gly-Asp) nos precursores das glicoproteínas do TCSV e do GRSV localizado na mesma posição de aminoácido. Além deste motivo, foi observada uma região rica em cisteína e uma região homóloga a  $\beta$ -lactamase-A nas duas espécies. Foi encontrada também uma região homóloga ao motivo zíper de leucina somente no precursor das glicoproteínas da espécie TCSV.

A estrutura secundária dos precursores das glicoproteínas do TCSV e do GRSV foi predita usando-se o método GOR IV (Garnier *et al.*, 1996). De acordo com este método, a maioria dos resíduos de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas de ambas as espécies foram preditas como possuindo a conformação "random coil" (54,69% para TCSV e 55,01% para GRSV), enquanto a conformação alfa hélice foi predominantemente localizada na porção mediana e na extremidade amino terminal dos polipeptídeos de ambas as espécies (18,23% para TCSV e 18,89% para GRSV) (dados não mostrados).

Seqüenciamento e análise comparativa da região intergência do M RNA do TCSV e do GRSV

A região intergênica (IGR) do M RNA do TCSV e do GRSV, presente entre o gene NS<sub>M</sub> e o gene precursor das glicoproteínas, foi totalmente seqüenciada. Similarmente ao que ocorre para outras espécies de tospovírus, a IGR do M RNA do TCSV e do GRSV mostrou regiões ricas em adenina pareando com regiões ricas em uracila, especialmente no meio do genoma dos precursores (dados não mostrados). A IGR do TCSV apresentou 357 nucleotídeos de comprimento enquanto a do GRSV apresentou 342 nucleotídeos (Tabela 2). A comparação da seqüência de nucleotídeos da IGR de várias espécies de tospovírus, mostrou 47% de identidade entre o TSWV e o TCSV e 55% de identidade entre o TSWV e o GRSV. Quando as seqüências da IGR do TCSV e do GRSV foram comparadas, a identidade de nucleotídeos aumentou para 78%.

Análise filogenética dos tospovírus baseada no precursor das glicoproteínas e na região intergênica do M RNA

O método da máxima parsimônia, usando pesquisa "branch & bound", pelo programa MEGA versão 2.1, resultou na construção de árvores parsimoniosas para o precursor das glicoproteínas e para a IGR do M RNA (Figuras 2 e 3, respectivamente). A árvore filogenética derivada do precursor das glicoproteínas dividiu os tospovírus em dois agrupamentos, sendo um composto pelos isolados de TSWV, TCSV, GRSV e INSV, e o outro constituído pelas espécies IYSV, WSMV, GBNV e PBNV (Figura 2). Por outro lado, a árvore filogenética construída a partir das seqüências da IGR do M RNA dos tospovírus, dividiu os tospovírus em três agrupamentos: o primeiro formado pelos isolados do TSWV, o segundo formado pelo TCSV e GRSV, e o terceiro formado pelo IYSV e INSV. As espécies WSMV e GBNV foram agrupadas separadamente das demais espécies de tospovírus analisadas (Figura 3).

## Discussão

Neste artigo, foi relatada a determinação da seqüência completa e a comparação do gene precursor das glicoproteínas, da região intergênica do M RNA e da região 3' não traduzida do M RNA de dois tospovírus, TCSV e GRSV. Esses vírus mostraram alta similaridade entre si e se diferenciaram das demais espécies de tospovírus.

O comprimento de segmentos específico das moléculas do M RNA de vários tospovírus revelou características interessantes. O INSV exibiu uma região 3' não traduzida não usual muito longa (Tabela 2). Os dados resultantes da região 3' não traduzida permitiram a divisão dos tospovírus analisados em três grupos bem definidos: o grupo do TSWV, TCSV e GRSV, o grupo do GBNV, WSMV e IYSV e o grupo monotípico do INSV (Tabela 2). O comprimento da região intergênica parece possuir importância biológica dentro de cada grupo, o que pode estar relacionado com as funções regulatórias e possivelmente dependem das estruturas primária e secundária destes segmentos. Notavelmente, a região 3' não traduzida do M RNA do TCSV e do GRSV foi quase idêntica (97%).

A predição dos domínios das proteínas usando-se o programa SMART (Schultz *et al.*, 1988; 2000), mostrou um sítio de clivagem peptídeo-sinal no aminoácido 36, localizado na extremidade amino terminal do precursor G1/G2 do TCSV e do GRSV, assim como cinco domínios transmembrânicos e seis sítios de *N*-glicosilação. A topologia do precursor das glicoproteínas do TCSV e do GRSV revelou um padrão bastante similar, diferindo apenas na posição dos aminoácidos que delimitam os domínios transmembrânicos e os sítios de *N*-glicosilação (Figura 1). As topologias do precursor das glicoproteínas dos tospovírus TSWV, PBNV, WSMV, INSV e IYSV foram comparadas por Cortez *et al.* (2002) através do programa SMART e indicaram a presença de quatro domínios transmembrânicos para todas as espécies comparadas, assim como 4-9 sítios de glicosilação entre as diferentes espécies. A presença de um domínio transmembrânico adicional no precursor das glicoproteínas do TCSV e do GRSV representou uma característica peculiar dessas duas espécies, sugerindo uma extensão extra da cadeia polipeptídica atravessando o envelope lipídico desses vírus.

Atualmente, é bem aceito o fato da transmissão e especificidade do vetor serem determinados pela interação das glicoproteínas do envelope dos tospovírus

com receptores presentes na superfície das células do intestino médio do inseto, mediando assim a aquisição da partícula viral pelo tripes (Bandla *et al.*, 1998). Foi sugerido que o motivo RGD (Arg-Gly-Asp), dentro da proteína G2 do TSWV e do INSV, possui uma função importante na ligação do vírus com a célula (Verkleij & Peters, 1983; Law *et al.*, 1992). Por outro lado, o precursor das glicoproteínas do GBNV, WSMV e IYSV não apresentaram o motivo RGD (Cortez *et al.*, 2002), apesar deste motivo estar presente no TCSV e GRSV. A função do motivo RGD ainda necessita ser melhor explicada, mas sua presença pode separar os tospovírus em dois grupos, o grupo do TSWV e o grupo do WSMV.

O ICTV propõe a classificação das espécies de tospovírus de acordo com critérios como: círculo de hospedeiras (amplo, intermediário e restrito), especificidade do vetor (espécies de tripes), relacionamento sorológico da proteína N e identidade da seqüência de aminoácidos da proteína N. A identidade de 90% é aceita como o critério de delimitação de espécies. A análise da seqüência do gene N de isolados intra-específicos disponíveis no banco de dados revelou uma porcentagem de identidade de 95-98% entre isolados do TCSV e 94-99% entre isolados do GRSV. No entanto, quando a comparação foi realizada entre isolados do TCSV e do GRSV, a identidade diminuiu para 81-87%. Tais resultados revelaram que TCSV e GRSV podem ser considerados como espécies de tospovírus distintas.

Silva *et al.* (2001) discutiram a questão da consistência dos critérios de delimitação de espécies de tospovírus e sugeriram que esta classificação poderia incluir outros parâmetros, como comparações entre as seqüências NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> dos tospovírus. Esses autores relataram a ocorrência de alta identidade (96,7%) entre as seqüências de aminoácidos da NS<sub>M</sub> do TCSV e GRSV. Além disso, eles propuseram o agrupamento dos tospovírus em dois grandes grupos: "Americano" (TSWV, TCSV, GRSV, *Chrysanthemum stem necrosis virus* – CSNV, *Zucchini lethal chlorosis virus* – ZLCV e INSV) e "Eurasiano" (GBNV, WSMV e IYSV), baseando-se na prevalência geográfica e na análise filogenética das proteínas N e NS<sub>M</sub>. Da mesma forma, a análise do comprimento da região 3' não traduzida resultou num agrupamento similar, formando o grupo do TSWV, TCSV e GRSV e o grupo do GBNV, WSMV e IYSV. A identidade de aminoácidos de 92% entre os precursores das glicoproteínas do TCSV e do GRSV corroborou para a necessidade de revisão dos critérios de taxonomia de tospovírus. O alto valor "bootstrap" obtido na comparação das glicoproteínas (Figura 2), formando os chamados grupos "Americano" e "Eurasiano",

pôde refletir a evolução das espécies de tospovírus em duas ramificações distintas (Figura 2). A função das glicoproteínas na especificidade e eficiência de transmissão dos tospovírus pelo vetor pode ser explicada pelo agrupamento conforme a distribuição geográfica das populações e espécies de tripses co-existent.

Entretanto, a identidade de 78% entre as seqüências de nucleotídeos da região intergênica do M RNA do TCSV e GRSV não colaborou com a idéia de tornar TCSV e GRSV uma só espécie de tospovírus. Pappu *et al.* (2000) observou maior identidade de seqüências de nucleotídeos entre isolados da mesma espécie de tospovírus (84 a 98%) do que entre espécies diferentes (46 a 59%). O valor de 78% situa-se entre essas duas categorias. A árvore filogenética gerada (Figura 3) agrupou os isolados do TSWV, mas a inexistência de seqüências adicionais de isolados de TCSV e GRSV impossibilitaram o entendimento dos aspectos evolucionários envolvidos com esta região da seqüência.

Os estudos epidemiológicos conduzidos no campo indicaram que o TCSV ocorreu em áreas localizadas e com importância restrita (de Ávila *et al.*, 1990; 1993a), enquanto o GRSV esteve largamente disseminado, causando severos danos econômicos no Brasil, África do Sul e Argentina (de Ávila *et al.*, 1990; 1993a; Dewey *et al.*, 1995; 1996). Um levantamento da ocorrência de tospovírus em tomate e pimentão realizado na região central do Brasil mostrou que ambas as espécies estavam presentes, apesar do GRSV apresentar maior incidência. As espécies TCSV e GRSV compartilham características biológicas semelhantes. Os estudos de eficiência de transmissão de quatro espécies de tripses confirmaram a similaridade do TCSV e GRSV, observando-se a mesma especificidade de transmissão e o mesmo padrão de replicação viral, diferindo-se do TSWV e CSNV (Nagata *et al.*, 2004). Esses autores relataram que a inoculação mecânica do TCSV e GRSV em plantas de *Capsicum chinense* 'PI159236' causou infecção sistêmica, ao passo que TSWV e CSNV causaram reação tipo hipersensibilidade nas folhas inoculadas, resultando no aparecimento de infecção local. O círculo de hospedeiros do TCSV e do GRSV, assim como os sintomas provocados nas plantas, são extremamente parecidos (de Ávila *et al.*, 1993b) e indistinguíveis em nível biológico. TCSV e GRSV possuem a identidade da seqüência de aminoácidos do gene N de 82,1% (de Ávila *et al.*, 1993a), sendo então consideradas espécies distintas. O relacionamento sorológico entre as duas espécies já foi relatado, apesar da diferenciação entre elas ser possível pela comparação da leitura de absorbância de ELISA (de Ávila *et al.*,

1993a). A comparação da NS<sub>M</sub> (Silva *et al.*, 2001), da região intergênica do M RNA, da região 3' não traduzida e do precursor das glicoproteínas do TCSV e do GRSV foi de 96,7%, 78%, 97% e 92%, respectivamente. Juntos, esses dados indicaram que os dois vírus foram extremamente similares. Como sugerido por Silva *et al.* (2001), é recomendável que seja realizada a revisão dos critérios de delimitação de espécies para esses vírus dentro do gênero *Tospovirus*.

### **Agradecimentos**

O suporte financeiro foi concedido pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB), projeto 480387/01-0. Nós agradecemos a Élcio Vieira da Silva Lopes, Lúcio Flávio Barbosa e Hamilton Lourenço, pelo suporte técnico. Este estudo foi parte integrante da tese de doutorado do programa de pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos internos usados no seqüenciamento do precursor das glicoproteínas do TCSV e GRSV.

Denominação do oligonucleotídeo	Orientação do oligonucleotídeo	Seqüência
TCSVINTFO1	Anterior	5' TATATGCATCTATATATTCAT 3'
TCSVINTRE1	Reverso	5' TGAGAAGCAGGCTCCTATTCT 3'
TCSVINTFO2	Anterior	5' GTTGAAGTTATAGATGGG 3'
TCSVINTRE2	Reverso	5' GGATACGTCTAATTTTG 3'
GRSVINTFO1	Anterior	5' CTAATCATCATCATCTTCTATCTTA 3'
GRSVINTRE1	Reverso	5' AAAGCTGTGTCTATCCAAGACATCCC 3'
GRSVINTFO2	Anterior	5' AGGTACACCATCATGGC 3'
GRSVINTRE2	Reverso	5' GGGATTGCATAATTAAGT 3'

**Tabela 2.** Características do genoma dos tospovírus.

Espécies	Códon de iniciação <sup>a</sup>	Códon de terminação <sup>a</sup>	de ORF <sup>b</sup>	IGR (nt)	3'UTR <sup>c</sup>	No.Amino-ácidos <sup>d</sup>	M.M. (kDa) <sup>e</sup>	M RNA (nt)
TCSV	4795	1369	3426	357	87	1141	128.46	4882
GRSV	4771	1354	3417	342	84	1138	128.16	4855
TSWV	4737	1330	3407	319	84	1135	127.4	4821
INSV	4803	1471	3332	472	169	1110	124.9	4972
GBNV	4754	1389	3365	407	47	1121	127.2	4801
WSMV	4833	1468	3365	472	47	1121	127.6	4880
IYSV	4789	1379	3410	377	49	1136	128.6	4838

TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*); GRSV (*Groundnut ringspot virus*); TSWV (*Tomato spotted wilt virus*); INSV (*Impatiens necrotic spot virus*); GBNV (*Groundnut bud necrosis virus*); WSMV (*Watermelon silver mottle virus*); IYSV (*Iris yellow spot virus*). As fontes das seqüências para análise estão listadas na legenda da Figura 2. O TSWV isolado TSWV-Gbr01 foi usado nesta análise.

<sup>a</sup>Posição do códon de iniciação/terminação a partir da extremidade 5' da seqüência do M RNA.

<sup>b</sup>Número de nucleotídeos pertencentes a fase de leitura aberta (ORF) do gene precursor das glicoproteínas.

<sup>c</sup>Número de nucleotídeos pertencentes à região 3' não traduzida do M RNA (3'UTR).

<sup>d</sup>Número de resíduos do precursor das glicoproteínas deduzidos a partir da seqüência de aminoácidos.

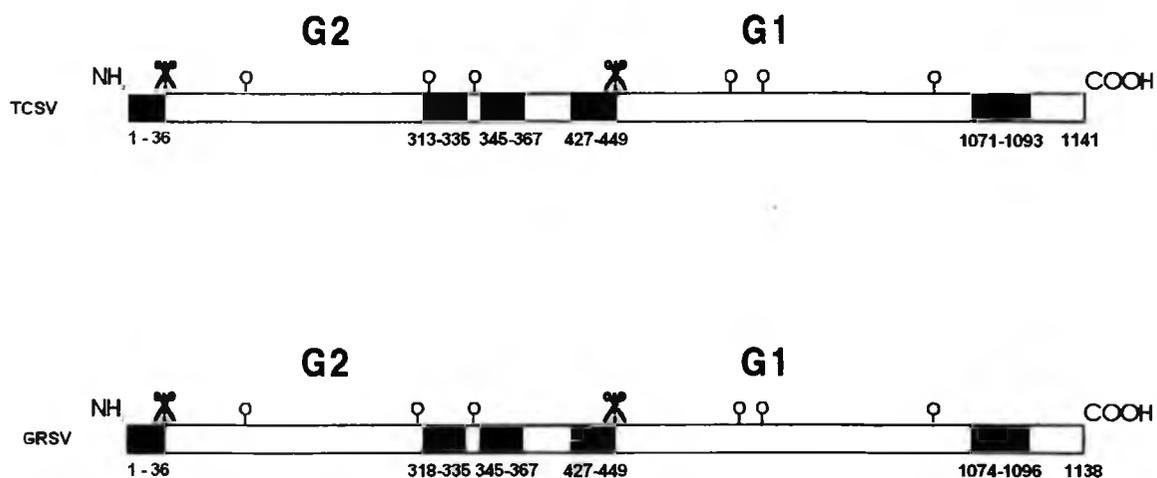
<sup>e</sup>Massa molecular do precursor das glicoproteínas, predita a partir da seqüência de aminoácidos deduzidos usando o programa Amino Acid Composition (NPSA).

**Tabela 3.** Porcentagem de identidade de aminoácidos do precursor das glicoproteínas entre tospovírus.

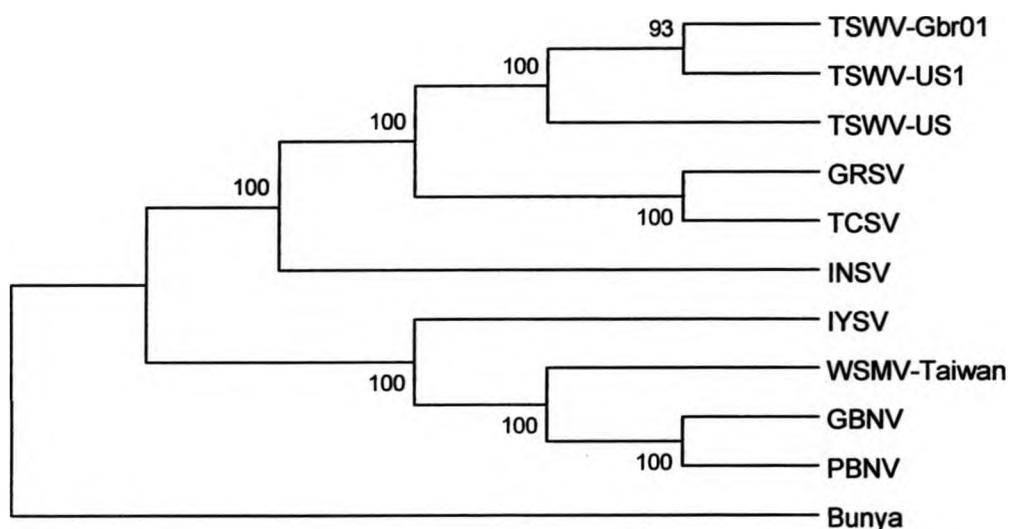
Espécies	TCSV	GRSV	TSWV	INSV	GBNV	WSMV	IYSV
TCSV	100 <sup>a</sup>						
GRSV	92	100					
TSWV	81	79	100				
INSV	62	60	65	100			
GBNV	32	33	33	35	100		
WSMV	32	32	33	34	88	100	
IYSV	33	33	33	35	62	62	100

TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*); GRSV (*Groundnut ringspot virus*); TSWV (*Tomato spotted wilt virus*); INSV (*Impatiens necrotic spot virus*); GBNV (*Groundnut bud necrosis virus*); WSMV (*Watermelon silver mottle virus*); IYSV (*Iris yellow spot virus*). As fontes das seqüências para análise estão listadas na legenda da Figura 2. O TSWV isolado TSWV-Gbr01 foi usado nesta análise.

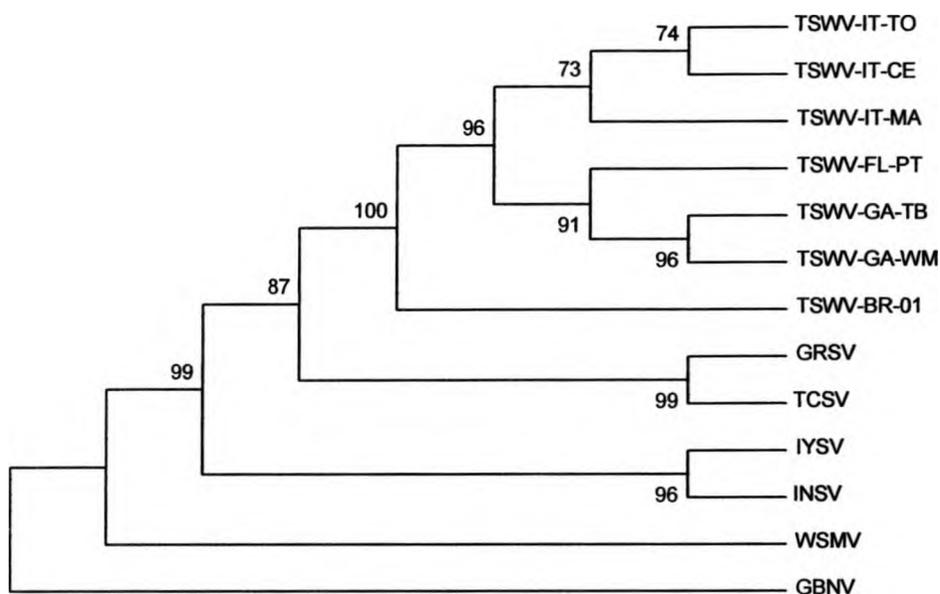
<sup>a</sup>As porcentagens de identidade entre as seqüências de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas foram obtidas usando-se ClustalW do Instituto de Bioinformática Europeu e DNASIS.



**Figura 1.** A topologia dos precursores das glicoproteínas do *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e do *Groundnut ringspot virus* (GRSV). Os retângulos pretos representam os domínios transmembrânicos. Os sítios de N-glicosilação preditos estão indicados como esferas brancas. As posições dos aminoácidos escritas abaixo dos precursores se referem aos potenciais sítios de clivagem (tesouras) e à posição dos domínios transmembrânicos.



**Figura 2.** Filogenia dos tospovírus baseada na seqüência de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas. Os alinhamentos de todas as seqüências de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas disponíveis foram usadas para obter a árvore filogenética. A árvore mais parsimoniosa foi construída usando-se MEGA versão 2.1 gerada pelo método da máxima parsimônia e programa de pesquisa "branch & bound". Os números abaixo das linhas indicam a freqüência de cada agrupamento após análise "bootstrap" com 1000 repetições. As fontes das seqüências de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas estão no GenBank com os números de acesso NC002050 para TSWV-Gbr01 (*Tomato spotted wilt virus*), AF208497 para TSWV-US1, AF208498 para TSWV-US, M74904 para INSV (*Impatiens necrotic spot virus*), AAL62023 para IYSV (*Iris yellow spot virus*), NC003841 para WSMV-Taiwan (*Watermelon silver mottle virus*), NP619703 para GBNV (*Groundnut bud necrosis virus*), M74904 para PBNV (*Peanut bud necrosis virus*) e NC001926 para *Bunyamwera virus* (Bunya).



**Figura 3.** Filogenia dos tospovírus baseada na seqüência de nucleotídeos da região intergênica do M RNA. Os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos da região intergênica do M RNA disponíveis foram usadas para obter a árvore filogenética mostrada. A árvore mais parsimoniosa foi construída usando-se o método da máxima parsimônia e o programa de pesquisa "branch & bound" do MEGA versão 2.1. Os números abaixo das linhas indicam a freqüência de cada agrupamento após a análise "bootstrap" com 1000 repetições. As fontes das seqüências de nucleotídeos da região intergênica do M RNA estão no GenBank com os números de acesso AJ428574 para TSWV-IT-TO, AJ309924 para TSWV-IT-CE, AJ309923 para TSWV IT-MA, AF135035 para TSWV FL-PT, AF135033 para TSWV GA-TB, AF135034 para TSWV GA-WM, S48091 para TSWV BR-01, AF214014 para IYSV, NC003616 para INSV, NC003841 para WSMV e NC003620 para GBNV.

## CAPÍTULO 3

### O gene do *Tomato spotted wilt virus* elicitor da reação de hipersensibilidade em *Capsicum chinense*

Fernanda A. Lovato<sup>1</sup>, Tatsuya Nagata<sup>2</sup>, Antônio Carlos de Ávila<sup>3</sup>, Renato de O. Resende<sup>1</sup> e Alice K. Inoue-Nagata<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular, UnB, Brasília, DF; <sup>2</sup>Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF; <sup>3</sup>Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.

**Resumo.** O tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) causa uma grave doença em centenas de espécies de plantas. O genoma do TSWV consiste de três segmentos lineares de RNA codificando três proteínas estruturais (L, G1/G2 e N) e duas proteínas não estruturais (NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub>). A inoculação mecânica do TSWV em acessos de *Capsicum chinense* 'PI152225' e 'PI159236' provoca reação tipo hipersensibilidade (RH). O objetivo deste estudo foi identificar o(s) gene(s) elicitor(es) da reação tipo hipersensibilidade em *C. chinense* 'PI159236', de acordo com a teoria gene-a-gene de Flor (1942). Com este propósito, os genes codificadores das proteínas N (nucleoproteína), NS<sub>M</sub> (movimento célula-célula) e NS<sub>S</sub> (supressora do silenciamento pós-transcricional do RNA) do TSWV foram amplificados por RT-PCR e clonados separadamente em um vetor de expressão binário baseado em sistema de expressão *Potato virus X* (pPVX). Os clones de *Agrobacterium tumefaciens* recombinantes, transformados com as construções PVX+N, PVX+NS<sub>M</sub> e PVX+NS<sub>S</sub>, e o controle (*A. tumefaciens* transformada com pPVX) foram individualmente inoculados em plantas de *C. chinense* 'PI159236', *Datura stramonium* e *Nicotiana benthamiana*. Nos primeiros estágios do desenvolvimento da infecção, sintomas como clorose internerval e mosqueado (característicos da infecção do PVX) apareceram nas plantas inoculadas com o controle pPVX e com as construções PVX+N, PVX+NS<sub>M</sub> e PVX+NS<sub>S</sub>. Os resultados das análises de ELISA e Western blotting realizados com folhas de *C. chinense*, *D. stramonium* e *N. benthamiana* infectadas, confirmaram a expressão das proteínas N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub>. Logo após o aparecimento dos primeiros sintomas de PVX, folhas de *C. chinense*, *D. stramonium* e *N.*

*benthamiana* inoculadas com a construção PVX+NS<sub>S</sub> mostraram severos sintomas necróticos sistêmicos, sugerindo um aumento na expressão dos sintomas provocados por PVX, causado possivelmente pelo sinergismo entre PVX e a proteína NS<sub>S</sub>. Lesões cloróticas e necróticas tipo HR seguidas por abscisão foliar foram observadas somente em plantas de *C. chinense* 'PI159236' inoculadas com a construção PVX+N. Este resultado indicou que o gene N é possivelmente o elicitor da reação tipo hipersensibilidade em *C. chinense* 'PI159236'.

Este trabalho foi premiado no XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia com o prêmio "Jovem Fitopatologista 2004" na modalidade melhor apresentação oral e será submetido com modificações para publicação na revista *Molecular Plant-Microbe Interactions*.

## **Introdução**

A teoria gene-a-gene proposta por Flor (1942) tem sido extensivamente usada para explicar relacionamentos genéticos em diferentes interações patógeno-hospedeiro, particularmente os mecanismos de resistência da planta contra o ataque de patógenos. Esta hipótese propõe que a resistência a um patógeno depende da presença do gene de resistência (R) na planta hospedeira interagindo com o equivalente gene de avirulência (Avr) ou elicitor presente no patógeno (Keen, 1990; Staskawicz *et al.*, 1995). Uma ampla variedade de respostas de defesa é induzida em uma planta resistente contendo o gene R mediado pela elicitação de produtos Avr do patógeno. O bloqueio do espalhamento do patógeno pela planta ocorre através da rápida morte celular do tecido da hospedeira no ponto que circunda a entrada do patógeno. Este processo, chamado reação de hipersensibilidade (RH) é uma típica reação de resistência baseada na teoria gene-a-gene. Este tipo de reação é frequentemente seguido pela síntese de compostos antimicrobianos, incluindo espécies de oxigênio reativas, ácido benzóico e salicílico, proteínas relacionadas à patogenicidade (PR), lipoxigenases, fitoalexinas e compostos fenólicos (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Mittler & Lam, 1996; Morel & Dangl, 1997) A RH pode ser fenotipicamente diversa, variando desde a reação em uma única célula até o aparecimento de áreas necróticas espalhadas,

acompanhando o limite da colonização do patógeno (Holub *et al.*, 1994). Visualmente, a manifestação da RH aparece como lesões locais necróticas na folha inoculada, seguida pela abscisão foliar.

A morte celular programada (“programmed cell death” ou PCD) é o provável mecanismo envolvido com a RH. PCD é um processo básico controlado geneticamente, ativado durante o desenvolvimento de organismos multicelulares em resposta à invasão de patógenos ou aos sinais de stress (Raff, 1998). Nos mamíferos, PCD ou apoptose é reconhecido como um fenômeno ubíquitinoso com características morfológicas peculiares. Em plantas, muitos tecidos ou órgãos inteiros sofrem morte celular como parte do seu desenvolvimento normal (senescência) ou em resposta ao estress ambiental ou causado por patógenos (Greenberg, 1996). Apesar do mecanismo de PCD em plantas estar pouco elucidado, muitas similaridades morfológicas e bioquímicas entre PCD em animais e plantas têm sido descritas em diferentes condições experimentais, incluindo condensação do núcleo e do citoplasma, clivagem do DNA em fragmentos pequenos de 180 pb (“DNA laddering”) e liberação do citocromo c a partir da mitocôndria (Danon *et al.*, 2000; Balk & Leaver, 2001; Lam *et al.*, 2001; Hoeberichts & Woltering, 2003).

O vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) é a espécie-tipo do gênero *Tospovirus*, integrante da família *Bunyaviridae*. Os tospovírus apresentam um enorme círculo de hospedeiros (mais de 1.000 espécies de plantas distribuídas em mais de 90 famílias botânicas), e são transmitidos na natureza pelo inseto vetor tripses de maneira circulativa propagativa. O genoma dos tospovírus é formado por três segmentos lineares de RNA, denominados L RNA, M RNA e S RNA. O L RNA possui polaridade negativa e contém uma única “open reading frame” (ORF), codificando a polimerase viral (L). O M RNA apresenta uma estratégia de codificação ambisenso, codificando a proteína não estrutural de movimento NS<sub>M</sub> no sentido viral e o precursor das glicoproteínas G1/G2 no sentido viral complementar. O S RNA também possui estratégia ambisenso, codificando a proteína não estrutural NS<sub>S</sub> no sentido viral, supressor do silenciamento pós-transcricional do RNA (Takeda *et al.*, 2002), e a nucleoproteína (N) no sentido viral complementar.

Os tospovirus estão entre os dez vírus mais prejudiciais em hortaliças e plantas ornamentais no mundo, podendo causar perdas anuais nas culturas de mais de um bilhão de dólares (German *et al.*, 1992; Goldbach & Peters, 1996; Prins & Goldbach, 1998). O rápido espalhamento do vetor tripes, *Frankliniella occidentalis*, pelo mundo possivelmente contribuiu para esta vasta disseminação. Uma das maneiras mais eficazes de controlar o vírus é o desenvolvimento de cultivares resistentes através da introgressão de genes de resistência naturais em genótipos comerciais. Em tomate, o gene Sw-5 foi identificado em *Lycopersicon peruvianum*, controlando a infecção sistêmica do TSWV, TCSV e GRSV (Stevens, 1964; Stevens *et al.*, 1992). Em pimenta, foram identificados vários acessos de *Capsicum chinense* expressando resposta tipo RH após serem inoculados mecanicamente com TSWV, incluindo PI152225, PI159236 e CNPH275 (Black *et al.*, 1991; Boiteux *et al.*, 1993; Boiteux & de Ávila, 1994). Os estudos de herança conduzidos com esses acessos mostraram que a resistência desses genótipos é monogênica, dominante e está localizada no mesmo locus, chamado *Tsw* (Boiteux, 1995; Black *et al.*, 1996; Moury *et al.*, 1997). Entretanto, as espécies de tospovirus *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV), quando inoculadas mecanicamente nestes genótipos, causaram infecção sistêmica (Boiteux & de Ávila, 1994). Recentemente, Roggero *et al.* (2002) relataram quebra da reação de resistência tipo RH de *Capsicum chinense* PI152252 ao TSWV. Isto aconteceu quando as plantas foram mantidas em altas temperaturas (>30°C) e dependeu do estágio de desenvolvimento da planta no momento da inoculação do vírus.

Neste artigo, foram investigados três genes do TSWV candidatos na elicitacão da reação tipo hipersensibilidade em *Capsicum chinense* 'PI159236'. Foram avaliados a expressão e os efeitos fenotípicos provocados pelos três genes do TSWV (nucleoproteína, proteína de movimento NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub>) em plantas de *C. chinense* 'PI159236', usando o vetor de expressão baseado em *Potato virus X* (PVX).

## **Materiais e métodos**

### **Fonte do vírus e purificação do RNA viral**

A espécie *Tomato spotted wilt virus* (TSWV-BR-01) (de Ávila *et al.*, 1990) foi mantida em *Nicotiana rustica* mediante inoculação mecânica do extrato foliar, usando-se tampão fosfato de sódio 0,05 M e sulfito de sódio 0,01 M, pH 7,0, em condições experimentais de casa de vegetação.

Os nucleocapsídeos do TSWV foram parcialmente purificados a partir das plantas de *N. rustica* infectadas sistemicamente com TSWV, conforme descrito por de Ávila *et al.* (1990). O RNA viral foi extraído a partir dos nucleocapsídeos virais usando-se o método Trizol (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. As manipulações com DNA e RNA foram executadas de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

### **RT-PCR dos genes N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> do TSWV**

As fitas de cDNA dos genes N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> do TSWV foram sintetizadas a partir do RNA purificado usando-se oligonucleotídeos anti-senso para cada gene (Tabela 1). Para as reações de retrotranscrição foi usada a enzima MMLV-RT (Invitrogen) e 100-500 ng do RNA viral purificado, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram mantidas a 37°C durante 1 hora.

Os cDNAs dos genes N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> do TSWV foram amplificados por PCR usando-se oligonucleotídeos específicos para cada gene (Tabela 1). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Mastercycler (Eppendorf) usando-se 2 µl do cDNA, 5 µl do tampão 10X Platinum High-Fidelity DNA polymerase (Invitrogen), 4 µl de 2.5 mM dNTP, 0.8 µl de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 ng do oligonucleotídeo NTSWV1 e NTSWV2 para a amplificação do N, 100 ng do oligonucleotídeo NSmTSWV1 e NSmTSWV2 para a amplificação do NS<sub>M</sub> e 100 ng do oligonucleotídeo NSsTSWV1 e NSsTSWV2 para a amplificação do NS<sub>S</sub> (Tabela 1), 0.25 U da Platinum High-Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen) e água, totalizando um volume de reação de 50 µl. As amostras foram inicialmente desnaturadas por 5 minutos a 94°C antes de

serem submetidas aos 30 ciclos de 94°C por 1 minute, 55°C por 1 minute e 72°C por 1 minute.

### Construção dos vetores de expressão recombinantes

Os produtos da PCR obtidos para os genes N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> do TSWV foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição *Cla*I e *Sa*II, fragmentados por tamanho em gel de agarose 1% e purificados a partir do gel de agarose (Sephaglass Band Prep Kit, Amersham/Bioscience) antes de serem ligados ao vetor de expressão binário pgR107 (PVX) (Jones *et al.*, 1999), digerido com *Cla*I e *Sa*II. O vetor pgR107 expressa um RNA do PVX infeccioso através do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus*, após a introdução dentro das células das plantas utilizando inoculação de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 (“agro-inoculação”) (Figura 1).

A clonagem dos fragmentos no vetor na orientação correta foi confirmada através de seqüenciamento automático dos clones recombinantes obtidos. Os plasmídeos recombinantes foram mantidos e propagados em *Escherichia coli* cepa XL-1 Blue e crescidos na presença do antibiótico canamicina (50 µg/ml). O DNA plasmidial das construções foi purificado a partir das culturas de *E. coli* mediante lise alcalina e foram usados para a transformação de *A. tumefaciens* cepa GV3101. As células bacterianas de *A. tumefaciens* cresceram durante dois dias a 28°C em placas contendo meio LB e ágar suplementadas com canamicina como agente seletivo. A seleção dos clones recombinantes foi realizada através de PCR de colônias usando-se os oligonucleotídeos específicos para cada gene (Tabela 1) e digestão dos DNAs plasmidiais dos clones com as enzimas de restrição *Cla*I e *Sa*II.

### Inoculação dos clones de *A. tumefaciens* recombinantes nas plantas alvo

As células de *A. tumefaciens* transformadas com as construções PVX+N, PVX+NS<sub>M</sub> e PVX+NS<sub>S</sub>, assim como o controle (*A. tumefaciens* transformada com o vetor pgR107 ou PVX), foram inoculadas com o auxílio de palito sobre as folhas cotiledonares de *Capsicum chinense* 'PI159236', *Datura stramonium* e *Nicotiana benthamiana* (2 a 5 folhas de idade). Nessas plantas, foram feitos de 2 a 6 furos nos cotilédones ou nas primeiras folhas verdadeiras (Figura 2). O desenvolvimento dos sintomas foi monitorado diariamente até 40 dias após a inoculação. Como controles adicionais do experimento, foram inoculados mecanicamente em *N. benthamiana* e *C. chinense* os vírus TSWV BR-01 e PVX selvagens, individualmente.

### ELISA e Western blotting

Todas as plantas inoculadas foram testadas quanto à expressão das proteínas N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> do TSWV, através de "double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) (Clark & Adams, 1977) e Western blotting.

Para a técnica de Western blotting, os extratos da proteína total foram desnaturados e separados em gel SDS-PAGE descontínuo (Laemmli, 1970), e em seguida foram eletro-transferidos para membranas de PVDF. Os filtros foram bloqueados em leite em pó desnatado 2% diluído em PBS. Para a detecção das proteínas N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub>, as membranas foram incubadas com anticorpos policlonais (1 µg/ml) contra essas proteínas durante toda a noite. Os complexos antígeno-anticorpo foram visualizados usando complexos da enzima alcalina fosfatase conjugada ao IgG anti-coelho e substrato NBT/BCIP.

## Resultados

### Construção dos vetores de expressão recombinantes e inoculação nas plantas

O vetor binário baseado em PVX foi escolhido para testar três genes candidatos a elicitores da RH em *C. chinense* 'PI159236'. Os vetores de PVX recombinantes, construídos através da clonagem dos genes N (PVX+N), NS<sub>M</sub> (PVX+NS<sub>M</sub>) e NS<sub>S</sub> (PVX+NS<sub>S</sub>) do TSWV no vetor pgR107 (pPVX) foram obtidos com sucesso. Após a transformação de *A. tumefaciens* cepa GV3101, seis clones foram inoculados nas plantas teste para a construção PVX+N, enquanto dois clones foram inoculados para PVX+NS<sub>M</sub> e PVX+NS<sub>S</sub>. Os primeiros sintomas nas plantas agro-inoculadas com pgR107 (pPVX) surgiram 7 a 9 dias após a inoculação e consistiram de clorose internerval e mosqueado em *D. stramonium* (Figura 3A), clorose internerval e mosqueado em *N. benthamiana* (Figura 3B) e clorose internerval e formação de manchas necróticas sistêmicas com centro marrom-claro e borda marrom-escura em *C. chinense* 'PI159236' (Figura 4A). Esses sintomas foram idênticos aqueles causados pelo vírus selvagem de PVX. Somente algumas plantas do total de plantas inoculadas com as construções de PVX recombinantes exibiram sintomas, e a taxa de infecção não foi relacionada com o número de furos feitos nas folhas durante a inoculação.

Folhas de *N. benthamiana* sistemicamente infectadas, que haviam sido agro-inoculadas com pPVX e com as construções PVX+N (clones 3, 4, 5, 6, 7 e 9), PVX+NS<sub>M</sub> (clones 1 e 2) e PVX+NS<sub>S</sub> (clones 5 e 8), foram usadas como fonte de inóculo para a inoculação mecânica em plantas de *C. chinense* 'PI159236', *D. stramonium* e *N. benthamiana* (Tabelas 2 e 3).

Todas as 18 plantas inoculadas mecanicamente com extrato foliar infectado com pPVX desenvolveram sintomas de PVX (Tabela 2). Entretanto, a eficiência da infecção variou de acordo com a construção recombinante inoculada. É desconhecido o fato da expressão de genes inseridos no vetor interferirem ou não com a infecção provocada pelo vetor PVX.

## Expressão dos genes do TSWV nas plantas

Foram coletadas folhas de cada planta inoculada para a realização dos testes de ELISA e Western blotting. Os testes de ELISA mostraram que as plantas inoculadas com as três construções e com o controle estavam infectadas por PVX. As análises de ELISA e Western blotting realizadas com antissoros contra as proteínas N e NS<sub>S</sub> do TSWV, demonstraram que os genes N e NS<sub>S</sub> clonados no vetor pgR107, foram eficientemente expressos nas plantas de *Capsicum chinense* 'PI159236' e *N. benthamiana* (Figura 5). A expressão da proteína NS<sub>M</sub> do TSWV em *C. chinense* e *N. benthamiana* foi confirmada através de ELISA (dados não mostrados).

## A expressão do gene N induziu reação tipo hipersensibilidade em *C. chinense* 'PI159236'

As plantas de *C. chinense* 'PI159236' inoculadas com extrato foliar infectado com pPVX (pgR107) apresentaram mosqueado, clorose internerval e necrose sistêmica, sintomas idênticos aos causados pela infecção de PVX, 10-15 dias após a inoculação (dpi) (Tabela 3; Figura 4A), enquanto a inoculação com a construção PVX+N resultou no desenvolvimento de lesões locais cloróticas nas folhas inoculadas, aproximadamente 8 dpi (Figura 6). Esses pontos cloróticos evoluíram para pontos e manchas necróticas marrom-escuros e com bordas delimitadas espalhadas pela folha, 15-30 dias dpi (Figuras 4B, 6 e 7A). Esses sintomas se localizaram em 1-3 folhas, ocorrendo abscisão foliar 30-35 dpi (Figura 8), sintomatologia semelhante à reação de resistência tipo hipersensibilidade. Consistentemente, no início da expressão dos sintomas, essas plantas apresentaram sintomas típicos do PVX, mas em 30 dias após a inoculação, os sintomas de PVX desapareceram. As folhas mais jovens tornaram-se completamente assintomáticas, ao passo que nas folhas velhas foram gradualmente aparecendo pontos cloróticos e necróticos a partir da ponta da folha até o pecíolo. Antes mesmo que os pontos necróticos atingissem a porção mediana da lâmina foliar, a folha caiu da planta. Este ciclo de aparecimento de pontos necróticos e abscisão foliar foi continuamente sendo observado durante o período avaliado. Então, a planta foi sistemicamente sendo infectada pelo PVX recombinante de modo que a lesões

apareceram continuamente nas folhas velhas. Por outro lado, *C. chinense* 'PI159236' infectado com pPVX mostrou mosqueado e necrose, sintomas claramente distintos dos provocados por plantas inoculadas com PVX+N. A ausência de sintomas nas folhas jovens das plantas inoculadas com PVX+N sugeriram que a proteína N interferiu no desenvolvimento da infecção do PVX. Investigações adicionais precisam ser conduzidas com o intuito de compreender os mecanismos moleculares ocorridos nesta interação.

**A expressão do gene NS<sub>M</sub> produziu sintomas típicos do PVX**

As plantas inoculadas com a construção PVX+NS<sub>M</sub> foram infectadas sistemicamente. Foram observados sintomas típicos de PVX em plantas de *C. chinense* 'PI159236', *D. stramonium* e *N. benthamiana* inoculadas com PVX+NS<sub>M</sub> e com pPVX (Tabela 3). Neste experimento, nenhum sintoma adicional causado pela expressão do gene NS<sub>M</sub> foi observado quando comparado aos controles das plantas inoculadas com pPVX e com o PVX selvagem.

**A expressão do gene NS<sub>S</sub> produziu necrose sistêmica severa**

A inoculação de *C. chinense*, *D. stramonium* e *N. benthamiana* com a construção PVX+NS<sub>S</sub> causou necrose sistêmica severa em todas as plantas, 13-15 dpi (Tabela 3; Figuras 9 e 10), freqüentemente seguida pela necrose das folhas e hastes ou morte da planta. Ao serem inoculadas com o controle (pPVX), essas plantas mostraram clorose internerval e mosqueado (Tabela 3). A expressão do gene NS<sub>S</sub> intensificou os sintomas causados pelo PVX, sugerindo a ocorrência de sinergismo entre a proteína NS<sub>S</sub> do TSWV e o PVX.

## Discussão

Neste capítulo, foi descrita a ocorrência de sintomas semelhantes aos induzidos pela reação de hipersensibilidade (lesões locais necróticas seguida por abscisão foliar) em *C. chinense* 'PI159236', após inoculação com a construção PVX+N, sugerindo que a nucleoproteína do TSWV é a elicitadora da RH nesta planta.

Diferentes proteínas virais têm sido identificadas como elicitores de avirulência, incluindo a RNA polimerase RNA dependente (Meshi *et al.*, 1988; Hamamoto *et al.*, 1997; Kim & Palukaitis, 1997; Padgett *et al.*, 1997; Erickson *et al.*, 1999), a proteína de movimento (Meshi *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1993; Weber & Pfitzner, 1998) e a proteína da capa (Bendahmane *et al.*, 1995; Berzal-Herranz *et al.*, 1995; Taraporewala & Culver, 1996; de la Cruz *et al.*, 1997). A proteína da capa (CP) do *Tobacco mosaic virus* (TMV) elicitou RH conferida pelo gene 'N' de *Nicotiana sylvestris*. Nessas plantas, o TMV ficou localizado nas células vizinhas às lesões necróticas formadas em estágios tardios da RH (Taraporewala & Culver, 1996). Em adição, a resposta mediada pela proteína da capa foi dependente de temperatura, pois RH e resistência ocorreram somente em temperaturas abaixo de 27°C (Kassanis, 1952; Chichkova *et al.*, 2004). Recentemente, foi demonstrado que a proteína da capa do tobamovírus age como elicitadora da resistência mediada tanto por *L2* quanto por *L4* em *Capsicum* (Gilardi *et al.*, 2004).

Por outro lado, foi relatado o primeiro exemplo de RNA não traduzível desencadeando resistência tipo RH em plantas infectadas por vírus (Szittyá & Burgyán, 2001). Neste experimento, uma região formada por 860 nucleotídeos de parte da seqüência que codifica a capa proteica do RNA do tombusvírus *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), foi responsável pela elicitação de resistência tipo RH em plantas de *Datura stramonium*.

A reação visual tipo RH em plantas de *C. chinense* 'PI159236' inoculadas com a construção PVX+N pode não ser causada pela expressão da proteína N, mas pelo RNA que codifica a proteína. A expressão das proteínas N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> em plantas de *C. chinense* foi confirmada pelas análises de ELISA e Western blotting, mas não foram suficientes para demonstrar

convincentemente que a proteína N elicitou RH. A construção de uma versão não traduzível do gene N será necessária para elucidar esta questão. A infecção do PVX selvagem e do pPVX em plantas de *C. chinense* 'PI159236' causou necrose sistêmica (Tabela 3). A ocorrência de sintomas necróticos pode interferir na avaliação apropriada da reação tipo hipersensibilidade. Entretanto, claras diferenças fenotípicas, baseadas nos sintomas foram vistas entre *C. chinense* inoculada com PVX e com PVX+N. As plantas inoculadas com pPVX mostraram mosqueado e desenvolvimento de lesões necróticas sistêmicas com as bordas irregulares escuras margeando centros marrom claros, enquanto as plantas inoculadas com PVX+N mostraram mosqueado e desenvolvimento de lesões necróticas menores marrom escuras com as bordas bem delimitadas, seguida por abscisão foliar. Indubitavelmente, as folhas superiores da planta pareciam estar sadias, ao passo que as folhas baixas apresentavam nítidos sintomas.

Com o intuito de provar a ocorrência de resistência tipo RH em *C. chinense* 'PI159236' induzida pela proteína N do TSWV, estudos adicionais usando-se técnicas bioquímicas e moleculares precisam ser conduzidos. As estratégias incluem a detecção de RH através de fragmentação do DNA ("DNA laddering"), "ion leakage", presença de espécies de oxigênio reativas, análises citoquímicas através de microscopia óptica usando-se corantes como lactofenol-trypan blue e anilina blue e verificação da ocorrência de morte celular programada usando-se kits anti-apoptóticos baseados na medição da atividade da caspase.

No presente trabalho, mostrou-se que a inoculação da construção PVX+NS<sub>M</sub> em *C. chinense*, *D. stramonium* e *N. benthamiana* não causou nenhum sintoma distinto ao provocado pela inoculação com o controle pPVX. No entanto, a inoculação da construção PVX+NS<sub>S</sub> causou severos sintomas necróticos sistêmicos em *C. chinense* 'PI159236', *D. stramonium* e *N. benthamiana*, corroborando com a função da proteína NS<sub>S</sub> como supressora do silenciamento pós-transcricional do RNA (Takeda *et al.*, 2002), possivelmente agindo como aceleradora da infecção do PVX.

Este estudo descreveu o uso do vetor binário baseado em PVX para investigar proteínas virais do TSWV envolvidas com a resistência tipo RH em

*C. chinense* 'PI159236'. Este sistema tem sido empregado para induzir silenciamento pós-transcricional tanto de transgenes quanto de genes endógenos da planta através de co-supressão, e representa uma eficiente ferramenta molecular para expressão transiente de genes exógenos no sistema vegetal (Jones *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001). Este sistema de expressão viral possui grande potencial devido à facilidade na seleção dos recombinantes do PVX. Como nos ensaios de imunização usados em mamíferos, o vetor PVX expressa a proteína em qualquer parte da planta infectada, aumentando assim a quantidade de resposta do tecido da planta de um único sítio de injeção para toda a planta, permitindo que o vírus se espalhe. Todavia, este método não eliminou os sintomas necróticos típicos de PVX produzidos em *C. chinense* após a inoculação. O tipo de necrose provocado por pPVX e por PVX+N foi claramente distinto, especulando-se que os mecanismos celulares envolvidos na resposta necrótica foi essencialmente diferente. No caso das plantas infectadas por PVX+N, este mecanismo parece ter sido o da morte celular programada.

Este é o primeiro relato da identificação do gene do TSWV elicitador de RH em *Capsicum chinense* 'PI159236'.

## **Agradecimentos**

O suporte financeiro foi concedido pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB), projeto 480387/01-0. Nós agradecemos a Élcio Vieira da Silva Lopes, Lúcio Flávio Barbosa e Hamilton Lourenço, pelo suporte técnico. Agradecemos também ao Dr. Sérgio Brommonschenkel pelo apoio técnico na condução dos experimentos com o vetor e à CIBio (Embrapa Hortaliças) pela regularização do laboratório nível NB2 para uso do vetor. O vetor binário baseado em PVX (pgR107) foi gentilmente concedido pelo Dr. David Baulcombe (The Sainsbury Laboratory, Norwich, United Kingdom) e os anticorpos contra as proteínas NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Virologia (Wageningen University, The Netherlands). Este estudo foi parte integrante da tese de doutorado do programa de pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes N, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub> do TSWV por RT-PCR.

Gene	Oligonucleotídeo	Orientação	
		do oligo	Sequência <sup>1</sup>
N	NTSWV1	Anterior	5' <u>CCCATCGAT</u> ATGTCTAAGGTTAAGCTC 3'
N	NTSWV2	Reverso	5' CCC <u>GTCGACTT</u> CAAGCAAGTTCTGCGAG 3'
NS <sub>M</sub>	NSmTSWV1	Anterior	5' CCCGTTTTAAAC <u>ATCGAT</u> ATGTTGACTCTTTTCG 3'
NS <sub>M</sub>	NSmTSWV2	Reverso	5' CCC <u>GTCGAC</u> ACTATATTTTCATCAAAG 3'
NS <sub>S</sub>	NSsTSWV1	Anterior	5' CCCCCATGG <u>ATCGAT</u> GTCTTCAAGTGTT 3'
NS <sub>S</sub>	NSsTSWV2	Reverso	5' CCC <u>GTCGACTT</u> ATTTTGATCCTGAACG 3'

<sup>1</sup>Os sítios das enzimas de restrição (ATCGAT- *Cla*I, GTCGAC- *Sal*I) estão sublinhados abaixo das seqüências.

**Tabela 2.** Frequência do aparecimento dos sintomas de PVX em plantas inoculadas com extrato foliar de *N. benthamiana* infectada com pPVX e com as construções.

	Construção			
	PVX+N	PVX+NS <sub>M</sub>	PVX+NS <sub>S</sub>	pPVX <sup>2</sup>
Clone <sup>1</sup>	3, 4, 5, 6, 7 e 9	1 e 2	5 e 8	1 e 2
Planta inoculada				
<i>D. stramonium</i>	8/12 <sup>3</sup>	2/4	4/4	6/6
<i>N. benthamiana</i>	8/12	4/4	4/4	3/3
<i>C. chinense</i> 'PI159236'	12/36	5/8	6/8	9/9

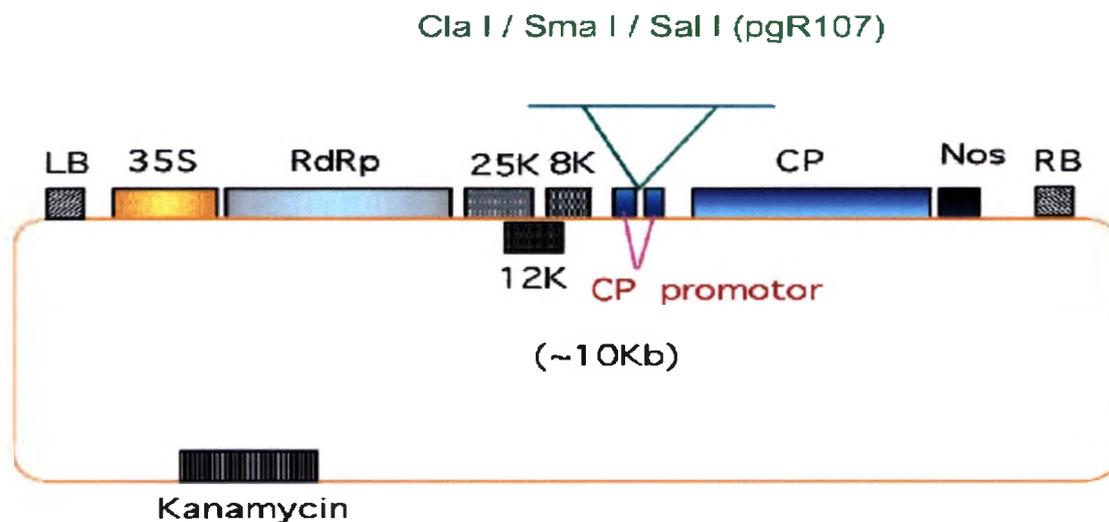
<sup>1</sup>Identificação dos clones recombinantes de cada construção.

<sup>2</sup>pgR107 sem inserto.

<sup>3</sup>Número de plantas sintomáticas/número de plantas inoculadas.

**Tabela 3.** Avaliação dos sintomas observados em plantas teste inoculadas mecanicamente com extrato foliar infectado com pPVX e com as construções.

Construção Planta teste	PVX+N	PVX+NS <sub>M</sub>	PVX+NS <sub>S</sub>	pPVX e PVX selvagem
<i>D. stramonium</i>	Pontos necróticos Clorose internerval Mosqueado	Clorose internerval Mosqueado	Necrose sistêmica na folha e no caule Morte da folha ou da planta	Clorose internerval Mosqueado
<i>N. benthamiana</i>	Clareamento de nervuras Mosqueado	Clareamento de nervuras Clorose internerval Mosqueado	Clorose Enrugamento Necrose sistêmica Morte da folha ou da planta	Clareamento de nervuras Clorose internerval Mosqueado
<i>C. chinense</i> 'PI159236'	Lesões sistêmicas cloróticas e necróticas marrom escuras Abscisão foliar	Clorose internerval Mosqueado Lesões sistêmicas irregulares necróticas com centro marrom claro delimitada por borda escura	Necrose severa na folha ou no caule	Clorose internerval Mosqueado Lesões sistêmicas irregulares necróticas com centro marrom claro circundado por borda escura

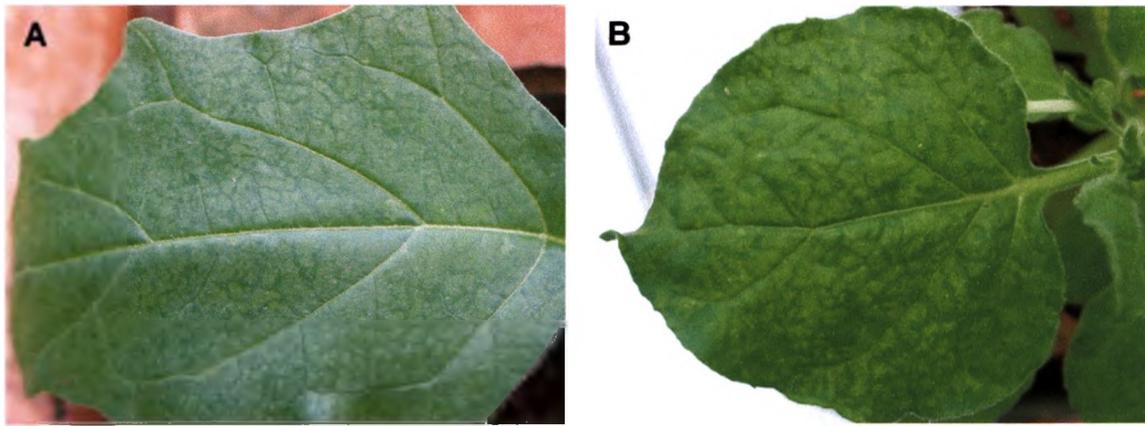


**Figura 1.** Representação esquemática do vetor de expressão binário pgR107.

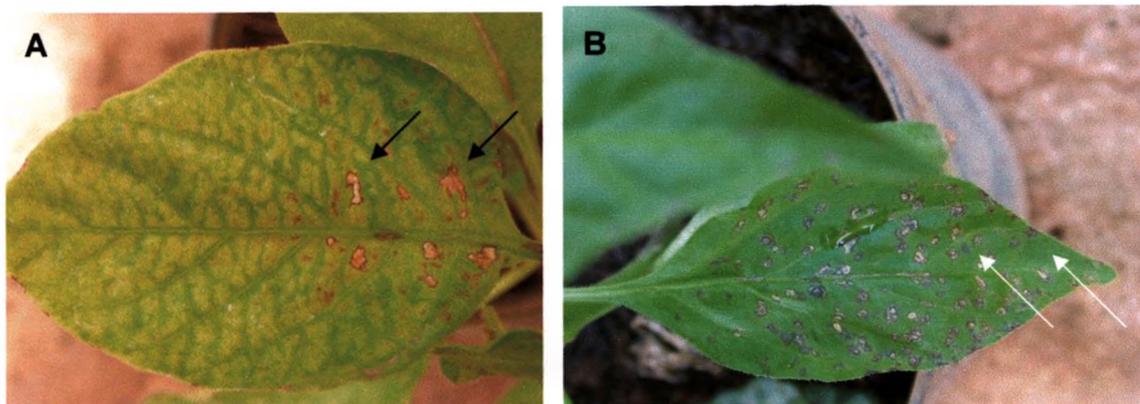
LB= Borda esquerda de *Agrobacterium tumefaciens*; RB= Borda direita de *Agrobacterium tumefaciens*; 35S= promotor de transcrição do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); RdRp= RNA polimerase RNA dependente do *Potato virus X* (PVX); 25K, 12K e 8K= proteínas de movimento do PVX ("triple-gene block"); CP promotor= promotor do gene da capa proteica do PVX; CP= proteína da capa do PVX; Nos= terminador de transcrição do gene nopalina sintase. Esta figura foi obtida do website <http://www.sainsbury-laboratory.ac.uk/David>.



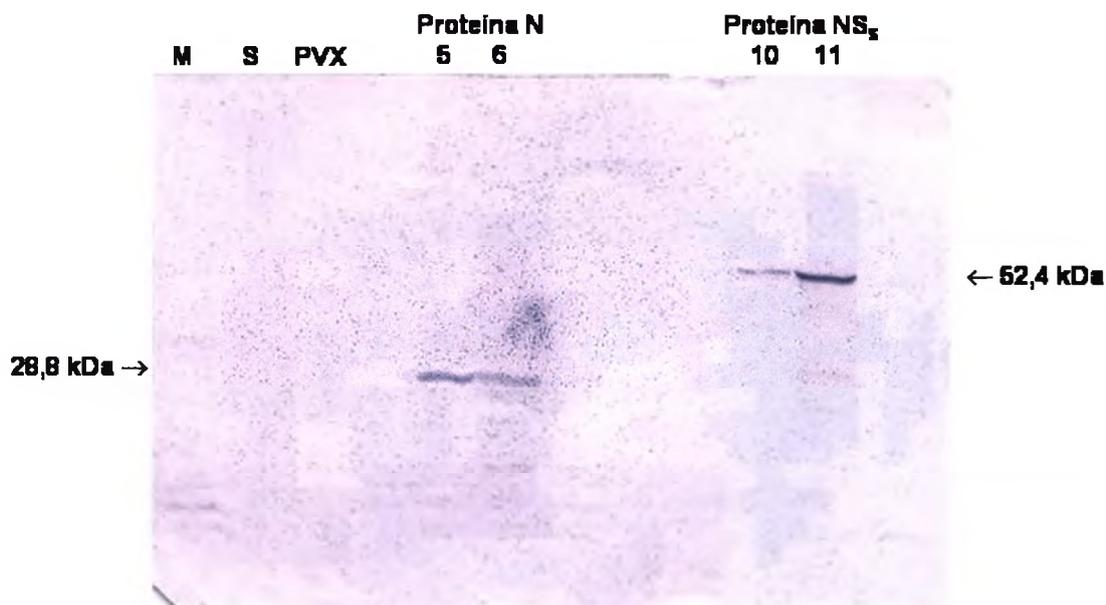
**Figura 2.** Agro-inoculação do vetor pgR107 (pPVX) recombinante em folhas de *Nicotiana benthamiana*.



**Figura 3.** Sintomas da infecção causada por pPVX (pgR107): **(A)** Clorose internerval e mosqueado em folha de *Datura stramonium*. **(B)** Clorose internerval e mosqueado em folha de *Nicotiana benthamiana*.



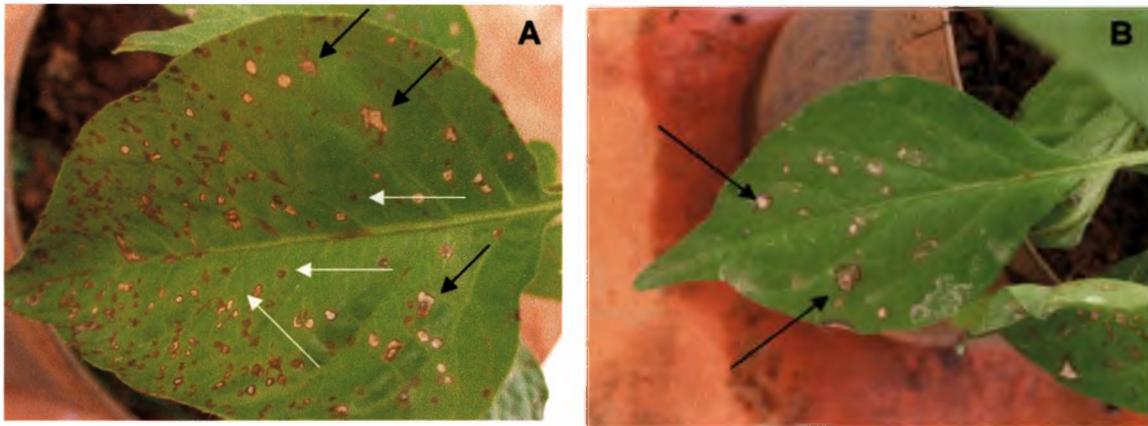
**Figura 4.** **A.** Clorose internerval e lesões necróticas sistêmicas irregulares marrom claras delimitadas por bordas escuras (setas pretas) em *Capsicum chinense* 'PI159236' induzidas por pPVX (pgR107). **B.** Lesões necróticas pequenas arredondadas marrom escuras (setas brancas) em *Capsicum chinense* 'PI159236' induzidas por PVX+N.



**Figura 5.** Resultado do Western blotting realizado com *Capsicum chinense* 'PI159236' e *Nicotiana benthamiana* inoculadas com pPVX, PVX+N e PVX+NS<sub>s</sub>. M = Marcador de massa molecular de proteínas; S = *C. chinense* sadia; PVX = *C. chinense* inoculada com pPVX; 5 = Poço do gel com *C. chinense* inoculada com a construção PVX+N; 6 = Poço do gel com *N. benthamiana* inoculada com a construção PVX+N; 10 = Poço do gel com *N. benthamiana* inoculada com a construção PVX+NS<sub>s</sub>; 11 = Poço do gel com *C. chinense* inoculada com a construção PVX+NS<sub>s</sub>; Proteína N = Antissoro contra a proteína N do TSWV; Proteína NS<sub>s</sub> = Antissoro contra a proteína NS<sub>s</sub> do TSWV.



**Figura 6.** Desenvolvimento de lesões sistêmicas cloróticas (setas brancas) e necróticas (setas pretas) em *Capsicum chinense* 'PI159236' inoculada com PVX+N.



**Figura 7. A.** *Capsicum chinense* 'PI159236' inoculada com PVX+N mostrando lesões sistêmicas típicas do pPVX (pgR107) (setas pretas) e do PVX+N (setas brancas). **B.** Lesões locais necróticas induzidas pelo *Tomato spotted wilt virus* em *Capsicum chinense* 'PI159236' (setas pretas).



**Figura 8.** Ocorrência de abscisão foliar (setas brancas) em *Capsicum chinense* 'PI159236' inoculada com PVX+N.



**Figura 9.** Desenvolvimento de necrose sistêmica seguida por morte da folha em *Datura stramonium* inoculada com PVX+NS<sub>S</sub>.



**Figura 10.** Desenvolvimento de necrose sistêmica seguida por morte da folha ou da planta em *Nicotiana benthamiana* inoculada com PVX+NS<sub>S</sub>.

## ANÁLISES CONCLUSIVAS

Esta tese foi desenvolvida em duas linhas de pesquisa fundamentais para o conhecimento das interações tospovírus-vetor e tospovírus-planta. A primeira parte abordou a determinação e análise das seqüências das glicoproteínas de duas espécies de tospovírus com ocorrência no Brasil, TCSV e GRSV, seguida pela comparação destas com as glicoproteínas de outras espécies de tospovírus. A segunda parte consistiu da identificação do provável gene de avirulência do TSWV responsável pela indução da reação de resistência tipo hipersensibilidade em *C. chinense* 'PI159236'.

As glicoproteínas virais G1 e G2 dos tospovírus desempenham função crucial durante a transmissão do vírus pelo inseto vetor tripses, provavelmente interagindo com receptores presentes na superfície das células do intestino desses insetos. Até o momento, dentre as seis espécies de tospovírus com ocorrência no Brasil, somente foi relatada a seqüência de nucleotídeos do gene precursor das glicoproteínas da espécie-tipo TSWV.

No Capítulo 2 deste trabalho, foram determinadas as seqüências de nucleotídeos da região intergênica do M RNA e dos genes precursores das glicoproteínas das espécies de tospovírus TCSV e GRSV. As comparações de nucleotídeos e aminoácidos entre estas seqüências revelaram alto grau de identidade de aminoácidos (92%) entre as seqüências dos precursores das glicoproteínas do TCSV e GRSV. Quando as mesmas seqüências foram comparadas com as dos precursores de outras espécies de tospovírus, observou-se maior identidade com TSWV, ou seja, 81% entre TCSV e TSWV e 79% entre GRSV e TSWV. Entretanto, o resultado da comparação das seqüências de nucleotídeos da região intergênica do M RNA do TCSV e GRSV, mostrou menor grau de identidade (78%).

A análise da predição de domínios dos precursores das glicoproteínas do TCSV e GRSV revelou padrão muito similar entre elas, diferindo apenas na posição dos aminoácidos que delimitam os sítios transmembrânicos e os sítios de *N*-glicosilação. Ambas as espécies apresentaram seqüências peptídeo-sinal com sítios de clivagem no aminoácido 36 localizado na região N-terminal dos

precursores, assim como cinco domínios transmembrânicos e seis sítios de *N*-glicosilação. As análises da predição de motivos demonstraram a presença do motivo RGD nos precursores das glicoproteínas das duas espécies, localizados na mesma posição de aminoácido em ambos os precursores.

As análises filogenéticas foram executadas, baseando-se no alinhamento das seqüências de aminoácidos dos precursores das glicoproteínas do TCSV e GRSV com a dos tospovírus disponíveis no banco de dados, assim como no alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região intergênica do M RNA de várias espécies de tospovírus. As duas árvores filogenéticas construídas mostraram a formação de um único agrupamento para TCSV e GRSV, próximo ao TSWV e INSV e distante dos agrupamentos das demais espécies (GBNV, WSMV e IYSV). As análises filogenéticas baseadas nas glicoproteínas e na região intergênica do M RNA dos tospovírus obtidas neste trabalho ajudam a explicar a prevalência geográfica dos tospovírus e corroboram os resultados de análises baseadas nas proteínas N e NS<sub>M</sub>, realizados por Silva *et al.* (2001). Estes autores sugeriram o agrupamento das espécies de tospovírus em dois grandes grupos, denominados “Grupo Americano” e “Grupo Eurasiano”, sendo que TCSV e GRSV efetivamente fazem parte do “Grupo Americano”.

Considerando-se as similaridades de seqüência e topologia das glicoproteínas, assim como resultados dos estudos de transmissão pelo tripe (Nagata *et al.*, 2004) entre as espécies TCSV e GRSV, este trabalho propõe a necessidade de revisão dos parâmetros de taxonomia dos tospovírus referentes à demarcação de espécies adotados atualmente. À medida que as seqüências das proteínas das várias espécies de tospovírus vão sendo determinadas, novos critérios de classificação de espécies de tospovírus possivelmente serão incluídos, como a identidade de seqüências de proteínas virais estruturais (glicoproteínas e polimerase) e não-estruturais (NS<sub>M</sub>, NS<sub>S</sub> e região intergênica) dos tospovírus.

Os resultados produzidos nesta tese serão importantes em experimentos de determinação da estrutura terciária das glicoproteínas e caracterização de seus domínios funcionais, na produção de anti-soros contra as glicoproteínas de TCSV e GRSV, usados para fins de detecção e, principalmente, na promoção de estudos de interação entre as glicoproteínas e os receptores

presentes dentro do corpo do tripses, por exemplo mediante o uso da técnica “yeast-two-hybrid-system”.

Nos últimos tempos, o estudo das interações patógeno-hospedeiro tem sido um dos temas científicos mais investigados em vários patossistemas. A descoberta da reação de hipersensibilidade ao TSWV em *Capsicum chinense* ‘PI159236’ foi inicialmente relatada por Black et al. (1991). O gene de resistência responsável por esta interação na planta foi identificado e mapeado (*Tsw*), e vem sendo utilizado em programas de melhoramento genético no Brasil (Boiteux & de Ávila, 1994; Boiteux et al., 1995). Por outro lado, a identificação do gene de avirulência do patógeno permanecia desconhecida. No Capítulo 3, foram observados os efeitos da expressão de três genes (nucleoproteína, NS<sub>M</sub> e NS<sub>S</sub>) do TSWV em *C. chinense* ‘PI159236’, visando a identificação do gene de avirulência do TSWV responsável pela RH. Os resultados obtidos, baseados em sintomatologia, indicaram que o gene N (nucleoproteína) é o provável gene de avirulência do TSWV elicitador de RH em *C. chinense* ‘PI159236’, ou contribui como integrante de um complexo de proteínas que interagem com o produto do gene *Tsw* para que esta reação ocorra. A expressão do gene N foi comprovada na planta de *C. chinense* ‘PI159236’ através de “western blot” e foram observados nas plantas agro-inoculadas com a construção PVX+N os sintomas típicos de RH, como o aparecimento de lesões necróticas espalhadas pela folha, seguida de abscisão foliar, aproximadamente 15 dias após a inoculação.

As informações geradas nesta tese permitirão que experimentos adicionais possam ser conduzidos visando comprovar a descoberta do gene de avirulência do TSWV elicitador de RH em *C. chinense* ‘PI159236’. Várias técnicas poderão ser usadas para este fim, incluindo: microscopia óptica dos tecidos foliares com RH, visualização da fragmentação do DNA (“DNA laddering”), “Northern blot” usando proteínas PR como sondas, medição da condutividade de íons na folha que apresenta RH (presença de espécies de oxigênio reativas), deleções ou mutações no gene de avirulência e posterior expressão desses mutantes usando vetores de expressão.

As interações proteína-proteína são um componente chave das trocas de respostas ocorridas entre plantas e patógenos na luta pela sobrevivência,

definindo o sucesso da batalha por parte das plantas (resistência) ou por parte do patógeno (doença). A descoberta das proteínas que interagem entre si numa reação de resistência representa o primeiro passo para a elucidação da complexa rede de vias metabólicas envolvidas nessas interações. O conhecimento dos intermediários bioquímicos integrantes de uma reação de resistência a um patógeno constituirá uma ferramenta importante para o controle deste patógeno no futuro. O homem poderá interferir na cadeia de reações bioquímicas que provocam determinada doença. Deste modo, este trabalho contribuiu na geração de informações essenciais para a compreensão da interação proteína-proteína, ocorrida durante a reação de hipersensibilidade no sistema TSWV-*Capsicum chinense* 'PI159236'.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, G.; KEGLER, H. Tomato spotted wilt virus and related tospoviruses. **Archives Phytopathologie und Pflanzenschutz**, v. 28, p. 483-504, 1994.
- ADAM, G.; YEH, S. H.; REDDY, D. V. R.; GREEN, S. K. Serological comparison of tospovirus isolates from Taiwan and India with *Impatiens necrotic spot virus* and different Tomato spotted wilt virus isolates. **Archives of Virology**, v. 130, p. 237-250, 1993.
- ADKINS, S. A.; CHOI, T. -J.; ISRAEL, B. A.; BANDLA, M. D.; RICHMOND, K. E.; SCHULTZ, K. T.; SHERWOOD, J. L.; GERMAN, T. L. Baculovirus expression and processing of Tomato spotted wilt tospovirus glycoproteins. **Phytopathology**, v. 86, p. 849-855, 1996.
- ADKINS, S.; QUADT, R.; CHOI, T. J.; AHLQUIST, P.; GERMAN, T. An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of Tomato spotted wilt virus, a plant- and insect-infecting *Bunyavirus*. **Virology**, v. 207, p. 308-311, 1995.
- ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, p. 390-397, 2001.
- AGRIOS, G. **Plant Pathology**. 4<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. **Plant Cell**, v. 8, p. 1683-1698, 1996.
- ALLEN, R. W.; BROADBENT, A. B. Transmission of Tomato spotted wilt virus in Ontario greenhouses by *Frankliniella occidentalis*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 8, p. 33-38, 1986.
- ALLEN, R. W.; MATTEONI, J. A.; BROADBENT, A. B. Factors relating to epidemiology and symptomatology in florist's chrysanthemum infected with the Tomato spotted wilt virus. In: PROCEEDINGS USDA WORKSHOP, 1990, Beltsville, USA. **Virus-thrips-plant interactions of tomato spotted wilt virus**. Beltsville, 1991, p. 28-45.
- ANDERSSON, A. M.; MELIN, L.; BEAN, A.; PETTERSSON, R. F. A retention signal necessary and sufficient for Golgi localization maps to the cytoplasmic tail of a *Bunyaviridae* (Uukuniemi virus) membrane glycoproteins. **Journal of Virology**, v. 71, p. 4717-4727, 1997.
- ARAÚJO, M. T.; ÁVILA, A. C.; CUPERTINO, F. P.; MALUF, W. R. *Lycopersicon hirsutum*, nova fonte de resistência ao vírus do víra-cabeça (TSWV). **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 164, 1983.

- AZEVEDO, N. Observações sobre uma doença de vírus do tomate. *Rodriguesia*, v.6, p.209-212, 1936.
- BAIROCH, A.; BUCHER, P.; HOFMANN, K. The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 217-221, 1997.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signalling in plant-microbe interactions. *Science*, v. 276, p. 726-733, 1997.
- BALK, J.; LEAVER, C. J. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell*, v. 13, p. 1803-1818, 2001.
- BANDLA, M. D.; CAMPBELL, L. R.; ULLMAN, D. E.; SHERWOOD, J. L. Interaction of Tomato spotted wilt virus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology*, v. 88, p. 98-104, 1998.
- BANSIDDHI, K.; SIRIPHONTANGMUN, S. Controlling orchid thrips in cut flowers by irradiation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THIRPS OF FLORAL AND VEGETABLE CROPS, 1995, Taichung, Taiwan. Taichung: AVRDC, 1995, p. 16.
- BAULCOMBE, D. C.; CHAPMAN, S.; SANTA CRUZ, S. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infection. *Plant Journal*, v. 7, p. 1045-1053, 1995.
- BEACHY, R. N.; LOESCH-FRIES, S.; TUMER, N. E. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, v. 28, p. 451-474, 1990.
- BEATY, B. J.; MILLER, B. R.; SHOPE, R. E.; ROZHON, E. J.; BISHOP, D. H. L. Molecular basis of bunyavirus per os infection of mosquitoes: role of the middle-sized RNA segment. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, v. 79, p. 1295-1297, 1982.
- BENDAHMANE, A.; KOHN, B. A.; DEDI, C.; BAULCOMBE, D. C. The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx-1-mediated virus resistance in potato. *Plant Journal*, v. 8, p. 933-941, 1995.
- BENT, A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell*, v. 8, p. 1757-1771, 1996.
- BERLING, A. Le TSWV, un feau qui se répand. *Phytoma*, v. 431, p. 43-45, 1991.
- BERZAL-HERRANZ, A.; DE LA CRUZ, A.; TENLLADO, F.; DÍAZ-RUIZ, J. R.; LÓPEZ, L.; SANZ, A. I.; VAQUERO, C.; SERRA, M. T.; GARCÍA-LUQUE, I. The

*Capsicum* L3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology*, v. 209, p. 498-505, 1995.

BEST, R. J. Tomato spotted wilt virus. *Advances in Virus Research*, v. 13, p. 65-148, 1968.

BEZERRA, I. C.; RESENDE, R. O.; POZZER, L.; NAGATA, T., KORMELINK, R.; DE ÁVILA, A. C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology*, v. 89, p. 823-830, 1999.

BISHOP, D. H.; CALISHER, C. H.; CASALS, J.; CHUMAKOV, M. P.; GAIDAMOVICH, S. Y.; HANNOUN, C.; LVOV, D. K.; MARSHALL, I. D.; OKER, B. N.; PETTERSSON, R. F.; PORTERFIELD, J. S.; RUSSELL, P. K.; SHOPE, R. E.; WESTAWAY, E. G. Bunyaviridae. *Intervirolgy*, v. 14, p. 125-143, 1980.

BISHOP, D. H. L.; GAY, M. E.; MATSUOKO, Y. Nonviral sequences are present at the 5' ends of one species of snowshoe hare bunyavirus S complementary RNA. *Nucleic Acids Research*, v. 11, p. 6409-6418, 1983.

BITANCOURT, A. A. A mancha anular do tomate. *O Biológico*, v.2, p. 98-100, 1936.

BLACK, L. L.; HOBBS, H. A.; GATTI, J. M. Tomato spotted wilt virus resistance in *Capsicum chinense* 'PI 152225' and 'PI 159236'. *Plant Disease*, v. 75, p. 863, 1991.

BLACK, L. L.; HOBBS, H. A.; KAMMERLOHR, D. S. Resistance of *Capsicum chinense* lines to Tomato spotted wilt virus from Louisiana, USA, and inheritance of resistance. *Acta Horticulturae*, v. 431, p. 393-401, 1996.

BÓ, E. D. Tomato spotted wilt virus on chrysanthemum in Argentina. *Plant Disease*, v. 79, p. 538, 1994.

BOITEUX, L. S. Allelic relationships between genes for resistance Tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. *Theoretical Applied Genetics*, v. 90, p. 146-149, 1995.

BOITEUX, L. S.; DE ÁVILA, A. C. Resistência ao Tomato spotted wilt virus (TSWV) na linhagem de pimenta CNPH679 controlada por um gene dominante. *Horticultura Brasileira*, v. 11, p. 63, 1993.

BOITEUX, L. S.; DE ÁVILA, A. C. Inheritance of a resistance specific to Tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense* 'PI 159236'. *Euphytica*, v. 75, p. 139-142, 1994.

BOITEUX, L. S.; GIORDANO, L. B. Screening *Lycopersicon* germplasm for resistance to a Brazilian isolate of Tomato spotted wilt virus (TSWV). **Rep. Tomato Genet. Coop.**, v. 42, p.13-14, 1992.

BOITEUX, L. S.; GIORDANO, L. B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, v. 71, p. 151-154, 1993.

BOITEUX, L. S.; GONZAGA, V.; SATURNINO, H. M. Groundnut ring spot tospovirus on field pepper (*Capsicum annuum*) in Janauba-MG. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 280, 1994.

BOITEUX, L. S.; NAGATA, T. Susceptibility of *Capsicum chinense* PI 159236 to Tomato spotted wilt virus isolates in Brazil. **Plant Disease**, v. 77, p. 210, 1993.

BOITEUX, L. S.; NAGATA, T.; DUTRA, W. P.; FONSECA, M. E. N. Sources of resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. **Euphytica**, v. 67, p. 89-94, 1993.

BONAS, U.; VAN DEN ACKERVEKEN, G. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: A general phenomenon in resistance to bacterial diseases? **Plant Journal**, v. 12, p. 1-7, 1997.

BOURNIER, A.; BOURNIER, J. P. L'introduction en France d'un nouveau ravageur: *Frankliniella occidentalis*. **Phytoma**, v. 388, p. 16-17, 1987.

BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L.; CUNHA, L. F.; GISMONDI, A. S.; FIGUEIREDO, D. V. Ocorrência de *Chrysanthemum stem necrosis virus*, em crisântemo, no estado do Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 140, 2004.

BRISSON, N.; PASZKOWSKI, J.; PENSWICK, J. R.; GRONENBORN, B.; POTRYKUS, I.; HOHN, T. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. **Nature**, v. 310, p. 511-514, 1984.

BRITTLEBANK, C. C. A new tomato disease spotted wilt. **Journal of Agriculture Victoria**, v. 27, p. 231-235, 1919.

CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de Fitopatologia**. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 2, p. 470-491.

CASALS, J. New developments in the classification of arthropod-borne viruses. **Anal. Microbiol.**, v. 11, p. 13-34, 1963.

CHAPMAN, E. J.; HILSON, P.; GERMAN, T. L. Association of L protein and in vitro Tomato spotted wilt virus RNA-dependent RNA polymerase activity. **Intervirology**, v. 46, p. 177-181, 2003.

CHAPMAN, S.; KAVANAGH, T.; BAULCOMBE, D. Potato Virus X as a vector for gene expression in plants. **Plant Journal**, v. 2, p. 549-557, 1992.

CHENG, S. S.; GREEN, S. K.; GRIGGS, T. D.; McLEAN, B. T. The use of *Capsicum chinense* as sweet pepper cultivars and sources for gene transfer. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INTEGRATED MANAGEMENT PRACTICES, 1998, Tainan, Taiwan. **Tomato and Pepper Production in the Tropics**. Tainan: AVRDC Publication, 1989, p. 55-62.

CHESTER, K. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quart. Rev. Biol.**, v. 8, p. 129-151, 1933.

CHICHKOVA, N. V.; KIM, S. H.; TITOVA, E. S.; KALKUM, M.; MOROZOV, V. S.; RUBTSOV, Y. P.; KALININA, N. O.; TALIANSKY, M. E.; VARTAPETIAN, A. B. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. **The Plant Cell**, v. 16, p. 157-171, 2004.

CHO, J. J.; MAU, R. F. L.; GERMAN, T. L.; HARTMANN, R. W.; YUDIN, L. S.; GONSALVES, D.; PROVIDENTI, R. A multidisciplinary approach to management of Tomato spotted wilt virus in Hawaii. **Plant Disease**, v. 73, p. 375-383, 1989.

CHO, J. J.; MAU, R. F. L.; ULLMAN, D. E.; CUSTER, D. M. Detection of Tomato spotted wilt virus within thrips. In: PROCEEDINGS USDA WORKSHOP, 1990, Beltsville, USA. **Virus-thrips-plant interactions of tomato spotted wilt virus**. Beltsville, 1991, p. 144-152.

CHO, J. J.; MITCHELL, W. C.; MAU, R. F. L.; SAKIMURA, K. Epidemiology of Tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. **Plant Disease**, v. 71, p. 505-508, 1987.

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, A.; DESIKAN, R.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. NO way back: Nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Plant Journal**, v. 24, p. 667-677, 2000.

COOK, D. F.; HOULDING, B. J.; STNEINER, E. C.; HARDIE, D. The native anthocorid bug *Orius armatus* (Heteroptera:Anthocoridae) as a field predator of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera:Thripidae) in Western Australia. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS OF FLORAL AND VEGETABLE CROPS. Program and abstracts, 1995, Taichung, Taiwan. Taichung: AVRDC, 1995, p. 19.

CORTEZ, M. I. M. G. M. **Caracterização de *Tospovirus* e desenvolvimento de técnicas moleculares para o seu diagnóstico**. 1999. 182 p. PhD Thesis. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal, 1999.

CORTEZ, I.; AIRES, A.; PEREIRA, A. -M.; GOLDBACH, R.; PETERS, D.; KORMELINK, R. Genetic organisation of *Iris yellow spot virus* M RNA: indications for functional homology between the G<sub>(C)</sub> glycoproteins of tospoviruses and animal-infecting bunyaviruses. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2313-2325, 2002.

COSTA, A. F. Doenças causadas por vírus em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, v. 17, p. 75-85, 1995.

COSTA, A. S.; FORSTER, R. Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus de "spotted wilt". **Bragantia**, v.1, p. 491-516, 1941.

COSTA, A. S.; KIEHL, J. Uma moléstia da batatinha, "necrose do topo", causada pelo vírus de vira-cabeça. **J. Agron.**, v.1, p. 193-202, 1938.

CRYNS, V.; YUAN, J. Proteases to die for. **Genes Dev.**, v. 12, p. 1551-1570, 1998.

CULVER, J. N.; DAWSON, W. O. Tobacco mosaic virus elicitor coat protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, p. 458-463, 1991.

CUPERTINO, F. P.; ÁVILA, A. C.; ARAÚFO, M. T.; MALUF, W. R. Fontes de resistência ao vírus de vira-cabeça em *Lycopersicon*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p. 330, 1986.

CUPERTINO, F. P.; LIN, M. T.; MUNOZ, J. O. Perdas na produção do pimentão induzidas pelo vírus de vira-cabeça do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 397, 1984.

CUPERTINO, F. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; BATISTA, M. F. Avaliação da reação de populações de *Capsicum* aos virus Y de batata e vira-cabeça do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, p. 148, 1988.

DANGL, J. L. Pièce de résistance: Novel classes of plant disease resistance genes. **Cell**, v. 80, p. 363-366, 1995.

DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A.; RICHBERG, M. H. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. **Plant Cell**, v. 8, p. 1793-1807, 1996.

DANON, A.; DELORME, V.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P. Plant programmed cell death: A common way to die. **Plant. Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 647-655, 2000.

DAWSON, W. O.; BUBRICK, P.; GRANTHAM, G. L. Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement and symptomatology. **Phytopathology**, v. 78, p. 783-789, 1988.

DAWSON, W. O.; LEWANDOWSKI, D. J.; HILF, M. E.; BUBRICK, P.; RAFFO, A. J.; SHAW, J. J.; GRANTHAM, G. L.; DESJARDINS, P. R. A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. **Virology**, v. 172, p. 285-292, 1989.

DE ÁVILA, A. C. **Diversity of tospovirus**. 1992. 136 p. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1992.

DE ÁVILA, A. C. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. **Horticultura Brasileira**, v. 11, p. 179-183, 1993.

DE ÁVILA, A. C.; DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R. O.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequence. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 153-159, 1993a.

DE ÁVILA, A. C.; DE HAAN, P.; SMEETS, M. L. L.; RESENDE, R.O.; KORMELINK, R.; KITAJIMA, E. W.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of relationship between tospovirus isolates. **Archives of Virology**, v. 128, p. 211-227, 1993b.

DE ÁVILA, A. C.; HUGUENOT, C.; RESENDE, R.; KITAJIMA, E. W.; GOLDBACH, R. W.; PETERS, D. Serological differentiation of twenty isolates of Tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 2801-2807, 1990.

DE ÁVILA, A. C.; LIMA, M. F.; RESENDE, R. O.; POZZER, L.; FERRAZ, E.; MARANHÃO, E. A. DE A; CANDEIA, J. A.; COSTA, N. D. Identificação de tospovírus em hortaliças no Submédio São Francisco utilizando DAS-ELISA e dot-ELISA. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 503-508, 1996.

DE HAAN, P.; GIELEN, J. J. L.; PRINS, M.; WIJKAMP, I. G.; VAN SCEPEN, A.; PETERS, D.; VAN GRINDVEN, M. Q. J. M.; GOLDBACH, R. Characterization of RNA-mediated resistance to Tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. **Bio/Technology**, v. 10, p. 1133-1137, 1992.

DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R. O.; VAN POELWIJK, F.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2207-2216, 1991.

DE HAAN, P.; WAGEMAKERS, L.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNA of Tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 3469-3473, 1989.

DE HAAN, P.; WAGEMAKERS, L.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The S RNA segment of Tomato spotted wilt virus has an ambisense character. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 1001-1007, 1990.

DE LA CRUZ, A.; LÓPEZ, L.; TENLLADO, F.; DÍAZ-RUÍZ, J. R.; SANZ, A. I.; VAQUERO, C.; SERRA, M. T.; GARCÍA-LUQUE, I. The coat protein is required for the elicitation of the capsicum L2 gene-mediated resistance against the tobamoviruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 107-113, 1997.

DEWEY, R. A.; SEMORILE, L. C.; GRAU, O. Molecular diversity of *Tospovirus* from Argentina: A summary. **Acta Horticulturae**, v. 431, p. 261-266, 1996.

DEWEY, R. A.; SEMORILE, L.; GRAU, O.; DE ÁVILA, A. C.; KITAJIMA, E. W. Characterization of the N gene of a Groundnut ringspot virus (GRSV) isolate from Argentina. **Journal of Phytopathology**, v. 143, p. 713-717, 1995.

DE WIT, P. J. G. M. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in the control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 391-418, 1992.

DE WIT, P. J. G. M. Fungal avirulence genes and plant resistance genes: Unraveling the molecular basis of gene-for-gene interactions. **Adv. Bot. Res.**, v. 21, p. 147-185, 1995.

DEL POZO, O.; LAM, E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. **Curr. Biol.**, v. 8, p. 1129-1132, 1998.

DEL POZO, O.; LAM, E. Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises *N* gene-mediated disease resistance response to *Tobacco mosaic virus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, p. 485-494, 2003.

DICKMAN, M. B.; PARK, Y. K.; OLTERS DORF, T.; LI, W.; CLEMENTE, T.; FRENCH, R. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 98, p. 6957-6962, 2002.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Adv. Genet.**, v. 28, p. 166-233, 1990.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 479-501, 1994.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 339-367, 1990.

DONSON, J.; KEARNEY, C. M.; HILF, M. E.; DAWSON, W. O. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic-based vector. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 7204-7208, 1991.

DUARTE, L. M.; RIVAS, E. B.; ALEXANDRE, M. A.; DE ÁVILA, A. C.; NAGATA, T.; CHAGAS, C. M. Chrysanthemum stem necrosis virus caused by a possible novel tospovirus. **Journal of Phytopathology**, v. 143, p. 569-571, 1995.

DUIJSINGS, D.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. Alfafa mosaic virus RNAs serve as cap donors for tomato spotted wilt virus transcription during co-infection of *Nicotiana benthamiana*. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 5172-5175, 1999.

DUIJSINGS, D.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. In vivo analysis of the TSWV cap-snatching mechanism: single base complementarity and primer length requirements. **Embo Journal**, v. 20, p. 2545-2552, 2001.

ELLIOT, R. M. *The Bunyaviridae*. New York: Plenum Press, 1996.

ELMER, S.; ROGERS, S. G. Selection for wild type size derivatives of Tomato golden mosaic virus during systemic infection. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 2001-2006, 1990.

ERICKSON, F. L.; HOLZBERG, S.; CALDERON-URREN, A.; HANDLEY, V.; AXTELL, M.; CORR, C.; BAKER, B. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defense response in tobacco. **Plant Journal**, v. 18, p. 67-75, 1999.

ESHITA, Y.; BISHOP, D. H. The complete sequence of the M RNA of snowshoe hare bunyavirus reveals the presence of internal hydrophobic domains in the viral glycoprotein. **Virology**, v. 137, p. 227-240, 1984.

FAJARDO, T. V. M.; LOPES, C. A.; WASHINGTON, L. C.; DE ÁVILA, A. C. Dispersão da doença e redução da produção em tomateiro industrial infectado por tospovírus no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 413-418, 1997.

FINLAY, K. W. Inheritance of spotted wilt virus resistance in the tomato. I. Identification of strains of the virus by the resistance or susceptibility of tomato species controlling spotted wilt resistance in four tomato types. **Australian Journal of Biological Science**, v. 5, p. 153-163, 1952.

FINLAY, K. W. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. **Austr. J. Sci. Res.**, v. 5, p. 305-314, 1953.

FLOR, H. H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v. 32, p.653-669, 1942.

FLOR, H. H. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. **Phytopathology**, v. 45, p. 680-685, 1947.

FRANCKI, R. I.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L.; BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology Supplementum 2**, 1991.

FRANCKI, R. I. B.; HATTA, T. Tomato spotted wilt virus. In: Kurstak. **Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnostics**. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. p. 492-512.

FRENCH, R.; JANDA, M.; AHLQUIST, P. Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells. **Science**, v. 231, p. 1294-1297, 1986.

GARNIER, J.; GIBRAT, J. F.; ROBSON, B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. **Methods in Enzymology**, v. 266, p. 540-553, 1996.

GEBRE-SELASSIE, K.; CHABRIÈRE, C.; MARCHOUX, G. Um virus qui se réveille- le tomato spotted wilt sur cultures légumières et florales. **Phytoma**, v. 410, p. 30-35, 1989.

GERMAN, T. L.; HU, Y.; MAU, R.; ULLMAN, D. E. Detection of tomato spotted wilt virus RNA in plants and thrips using strand-specific probes. In: PROCEEDINGS USDA WORKSHOP, 1990, Beltsville, USA. **Virus-thrips-plant interactions of tomato spotted wilt virus**. Beltsville, 1991, p. 137-143.

GERMAN, T. L.; ULLMAN, D. E.; MOYER, J. W. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 315-348, 1992.

GIELEN, J. J. L.; DE HAAN, P.; KOLLA, J.; PETERS, D.; VAN GRINSVEN, M. Q. J. M.; GOLDBACH, R. W. Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative-strand RNA virus. **Bio/Technology**, v. 9, p. 1366-1367, 1991.

GILARDI, P.; GARCIA-LUQUE, I.; SERRA, M. T. The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L2 and L4 gene-mediated resistance in Capsicum. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2077-2085, 2004.

GIORDANO, L. B.; BOITEUX, L. S.; HORINO, H. Avaliação em condições de campo de genótipos de tomate para resistência a tospovirose. **Horticultura Brasileira**, v. 12, p. 176-178, 1994.

GOLDBACH, R. W.; KUO, G. Introduction. In: International symposium on tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops. *Acta Horticulturae*, v. 431, p. 21-26, 1996.

GOLDBACH, R. W.; PETERS, D. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology*, v. 5, p. 113-120, 1994.

GOLDBACH, R. W.; PETERS, D. Molecular and biological aspects of tospoviruses. In: Elliot, R. M. *The Bunyaviridae*. New York: New York Press, 1996. p.129-157.

GONÇALVES, P. A. S.; GUIMARÃES, D. R. Controle químico de *Thrips tabaci* na cultura da cebola. *Horticultura Brasileira*, v. 13, p. 28-31, 1995.

GONSÁLEZ-SCARANO, F. La Crosse virus G1 glycoprotein undergoes a conformational change at the pH of fusion. *Virology*, v. 140, p. 209-216, 1985.

GRASSELLY, D.; BERTAUX, F.; ÇALDUMBIDE, C. Principales espèces de thrips sur plantes maraichères, fruitières et ornementales. *Phytoma*, v. 422, p. 26-34, 1990.

GREEN, D. R. Apoptotic pathways: The roads to ruin. *Cell*, v. 94, p. 695-698, 1998.

GREENBERG, J. T. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, v. 93, p. 12094-12097, 1996.

HAGAN, A. K.; WEEKS, J. R.; FRENCH, J. C.; GUDAUSKAS, R. T.; MULEN, J. M.; GAZAWAY, W. S.; SHELBY, R. Tomato spotted wilt virus in peanut in Alabama. *Plant Disease*, v. 74, p. 615, 1990.

HAMAMOTO, H.; WATANABE, Y.; KAMADA, H.; OKADA, Y. Amino acid changes in the putative replicase of tomato mosaic tobamovirus that overcome resistance in Tm-1 tomato. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 461-464, 1997.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 575-607, 1997.

HANSEN, G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 13, p. 649-657, 2000.

- HAUSBECK, M. K.; WELLIVER, R. A.; DERR, M. A.; GILDOW, F. E. Tomato spotted wilt virus survey among greenhouse ornamentals in Pennsylvania. **Plant Disease**, v. 76, p. 795-800, 1992.
- HAYES, R. J.; COUTTS, R. H. A.; BUCK, K. W. Stability and expression of bacterial genes in replicating geminivirus vectors in plants. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 2391-2403, 1989.
- HAYES, R. J.; PETTY, I. T. D.; COUTTS, R. H. A.; BUCK, K. W. Gene amplification and expression in plants by a replicating geminivirus vector. **Nature**, v. 334, p. 179-182, 1988.
- HOBBS, H. A.; BLACK, L. L.; JOHNSON, R. R.; VALVERDE, R. A. Differences in reactions among tomato spotted wilt virus isolates to three resistant *Capsicum chinense* lines. **Plant Disease**, v. 78, p. 1220, 1994.
- HOEBERICHTS, F. A.; WOLTERING, E. J. Multiple mediators of plant programmed cell death: Interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. **Bioessays**, v. 25, p. 47-57, 2003.
- HOLUB, E. B.; BEYNON, L. J.; CRUTE, I. R. Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 223-339, 1994.
- HOMES, F. O. Resistance to spotted wilt in tomato. **Phytopathology**, v. 38, p. 467-473, 1948.
- HUISMAN, M. J.; LINTHORST, H. J. M.; BOL, J. F.; CORNELISSEN, B. J. C. 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.
- IE, T. S. Electron microscopy of development stages of tomato spotted wilt virus in plant cells. **Virology**, v. 2, p. 468-479, 1971.
- IE, T. S. A sap-transmissible defective form of tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, v. 59, p. 387-392, 1982.
- IHARA, T.; SMITH, J.; DALRYMPLE, J. M.; BISHOP, D. H. Complete sequences of the glycoproteins and M RNA of Punta Toro phlebovirus compared to those of Rift Valley fever virus. **Virology**, v. 144, p. 246-259, 1985.
- IIZUKA, N.; BOITEUX, L. S.; GIORDANO, L. B.; NAGATA, T.; DUSI, A. N. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in wild *Lycopersicon* species. **Rep. Tomato Genet. Coop.**, v. 43, p. 20-22, 1993.

INOUE-NAGATA, A. K.; KORMELINK, R.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E. W.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Effects of temperature and host on the generation of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs. **Phytopathology**, v. 87, p.1168-1173, 1997.

INOUE-NAGATA, A. K.; KORMELINK, R.; SGRO, J. -Y.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E. W.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Molecular characterization of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs and detection of truncated L proteins. **Virology**, v. 248, p. 342-356, 1998.

JONES, R. K.; BAKER, J. R. TSWV: symptoms, host range and spread. In: PROCEEDINGS USDA WORKSHOP, 1990, Beltsville, USA. **Virus-thrips-plant interactions of tomato spotted wilt virus**. Beltsville, 1991, p. 89-93.

JONES, L.; HAMILTON, A. J.; VOINNET, O.; THOMAS, C. L.; MAULE, A. J.; BAULCOMBE, D. C. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. **Plant Cell**, v. 11, p. 2291-2301, 1999.

JORDA, C.; NUEZ, F.; LACASA, A. Situación actual de la virosis del bronceado en los cultivos españoles. **Phytoma España**, v. 66, p. 20-23, 1995.

JORDA, C.; VISER, P.; DIEZ, M. J.; ROSELLO, S.; NUEZ, F.; LACASA, A.; COSTA, L. Biological and serological characterization of TSWV isolates. **Capsicum Newsletter**, v.13, p. 83-85, 1994.

JOSHI, R. L.; JOSHI, V.; OW, D. W. BSMV genome mediated expression of a foreign gene in dicot and monocot plant cells. **EMBO Journal**, v. 9, p. 2663-2669, 1990.

KAMOUN, S. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, p. 295-300, 2001.

KAMOUN, S.; HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS, V. G. A. A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? **Trends Plant Sci.**, v. 4, p. 196-200, 1999.

KAMOUN, S.; LINDQVIST, H.; GOVERS, F. A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 1028-1030, 1997.

KAMOUN, S.; VAN WEST, P.; VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; DE GROOT, K.; GOVERS, F. Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. **Plant Cell**, v. 10, p. 1413-1425, 1998.

KARRER, E. E.; BEACHY, R. N.; HOLT, C. A. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. **Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 681-690, 1998.

KASSANIS, B. Some effects of high temperature on susceptibility of plants to infection with viruses. **Ann. Appl. Biol.**, v. 26, p. 358-369, 1952.

KAUFMANN, S. H.; HENGARTNER, M. O. Programmed cell death: Alive and well in the new millennium. **Trends Cell Biology**, v. 11, p. 526-534, 2001.

KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v. 24, p. 447-463, 1990.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p.239-257, 1972.

KIKKERT, M. **Role of the envelope glycoproteins in the infection cycle of tomato spotted wilt virus**. 1999. 117 f. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1999.

KIKKERT, M.; MEURS, C.; VAN DE WETERING, F.; DORFMULLER, S.; PETERS, D.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips protein. **Phytopathology**, v. 88, p. 63-69, 1998.

KIKKERT, M.; VAN LENT, J.; STORMS, M.; BODEGOM, P.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. **Journal of Virology**, v. 73, p. 2288-2297, 1999.

KIKUTA, K.; FRAZIER, W. A. Breeding tomatoes for resistance to spotted wilt in Hawaii. **Proceedings American Society of Horticulture Science**, v. 47, p. 241-276, 1946.

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 Journal**, v. 16, p. 4060-4068, 1997.

KITAJIMA, E. W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1911-1985), 1986.

KITAJIMA, E. W.; DE ÁVILA, A. C.; RESENDE, R. O.; GOLDBACH, R. W.; PETERS, D. Comparative cytological and immunogold labelling studies on different isolates of tomato spotted wilt virus. **Journal of Submicroscopical Cytology and Pathology**, v. 24, p. 1-14, 1992.

KITAJIMA, E. W.; RESENDE, R. O.; DE ÁVILA, A. C.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Immuno-electron microscopical detection of Tomato spotted wilt virus and its nucleocapsids in crude plant extracts. **Journal of Virological Methods**, v. 38, p. 313-322, 1992.

- KNOGGE, W. Fungal infection of plants. *Plant Cell*, v. 8, p. 1711-1722, 1996.
- KOENING, R.; LESEMAN, D. E. Potato virus X, potexvirus group. In: Murant, A. F.; Harrison, B. D. **AAB Descriptions of Plant Viruses**. N° 354. Warwick: Association of Applied Biologists, 1989. p. 5.
- KORMELINK, R. **Structure and expression of the tomato spotted wilt virus genome, a plant-infecting bunyavirus**. 1994. 134 p. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1994.
- KORMELINK, R.; DE HAAN, P.; MEURS, C.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus: a plant-infecting bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 2795-2804, 1992a.
- KORMELINK, R.; DE HAAN, P.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Viral synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 687-693, 1992b.
- KORMELINK, R.; KITAJIMA, E. W.; DE HAAN, P.; ZUIDEMA, D.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology*, v. 181, p. 459-468, 1991.
- KORMELINK, R.; STORMS, M.; MOHAMED, N. A.; VAN LENT, J.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Expression and cellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*, v. 200, p. 56-65, 1994.
- KRITZMAN, A.; GERA, A.; RACCAH, B.; VAN LENT, J. W. M.; PETERS, D. The route of tomato spotted wilt virus inside the thrips body in relation to transmission efficiency. *Archives of Virology*, v. 147, p. 2143-2156, 2002.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. **MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software**. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA, 2001.
- LACASA, A. Datos de taxonomía, biología y comportamiento de *Frankliniella occidentalis*. *Phytoma España*, v. 9, p.15, 1990.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews*, v. 5, p. 305-314, 2004.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, v. 411, p. 848-853, 2001.

LAPPIN, D. F.; NAKITARE, G. W.; PALFREYMAN, J. W.; ELLIOT, R. M. Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 3441-3451, 1994.

LAW, M. D.; MOYER, J. W. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 933-938, 1990.

LAW, M. D.; SPECK, J.; MOYER, J. W. The M RNA of Impatiens necrotic spot Tosspovirus (Bunyaviridae) has an ambisense genomic organization. *Virology*, v.188, p.732-741, 1992.

LAWSON, R. H.; DIENELT, M. M.; HSU, H. T. Ultrastructural comparisons of defective, partially defective, and non-defective isolates of impatiens necrotic spot virus. *Phytopathology*, v. 86, p. 650-661, 1996.

LEFEBVRE, D. D.; MIKI, B. L.; LALIBERTÉ, J. J. Mammalian metallothionein functions in plants. *Biotechnology*, v. 5, p. 1053-1056, 1987.

LONG, S.; STASKAWICZ, B. Prokaryotic plant parasites. *Cell*, v. 73, p. 921-935, 1993.

LUDWIG, G. V.; CHRISTENSEN, B. M.; YUILL, T. M.; SCHULTZ, K. T. Enzyme processing of La Crosse virus glycoprotein G1: a bunyavirus-vector infection model. *Virology*, v. 171, p. 108-113, 1989.

LUDWIG, G. V.; ISRAEL, B. A.; CHRISTENSEN, B. M.; YUILL, T. M.; SCHULTZ, K. T. Role of La Crosse virus glycoprotein G1 in attachment of virus to host cells. *Virology*, v. 181, p. 564-571, 1991.

MACKENZIE, D. J.; ELLIS, P. J. Resistance to tomato spotted wilt virus infection in transgenic tobacco expressing the viral nucleocapsid gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 5, p. 34-40, 1992.

MALUF, W. R.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R. D. Progress in breeding tomatoes for resistance to tomato spotted wilt in Brazil. *Revista Brasileira de Genética*, v. 14, p. 509-525, 1991.

MARCHOUX, G.; GÉBRÉ-SELASSIE, K.; VILLEVIEILLE, M. Detection of tomato spotted wilt virus and transmission by *Frankliniella occidentalis* in France. *Plant Pathology*, v. 40, p. 347-351, 1991.

MARRIOT, A. C.; el-GHORR, A. A.; NUTTALL, P. A. Dugbe Nairovirus M RNA: nucleotide sequence and coding strategy. *Virology*, v. 190, p. 606-615, 1992.

MATSUNAGA, Y.; MASCA, M. G. C. C.; NORONHA, A. B. Ação de extratos vegetais em tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infectados com vira-cabeça. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 215, 1992.

MATSUOKA, Y.; CHEN, S. Y.; HOLLAND, C. E.; COMPANS, R. W. Molecular determinants of Golgi retention in the Punta Toro virus G1 protein. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 336, p. 184-189, 1996.

MATTEONI, J. A.; ALLEN, W. R. Symptomatology of tomato spotted wilt virus infection in florist's chrysanthemum. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, p. 373-380, 1989.

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.

MATTHEWS, R. E. F. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Intervirology**, v. 17, p. 1-200, 1982.

McMICHAEL, L. A.; DENIS, D. M.; JOHN, E.; THOMAS, J. E. A new tospovirus serogroup IV species infecting capsicum and tomato in Queensland, Australia. **Australian Plant Pathology**, v. 31, p. 231-239, 2002.

MEDEIROS, R. B.; RESENDE, R. O.; DE ÁVILA, A. C. The plant virus Tomato spotted wilt tospovirus activates the immune system of its main insect vector, *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Virology**, v. 78, p. 4976-4982, 2004.

MEDEIROS, R. B.; ULLMAN, D. E.; SHERWOOD, J. L.; GERMAN, T. L. Immunoprecipitation of a 50-kDa protein: a candidate receptor component for tomato spotted wilt tospovirus (*Bunyaviridae*) in its main vector, *Frankliniella occidentalis*. **Virus Research**, v. 67, p. 109-118, 2000.

MESHI, T. F.; MOTOYOSHI, F.; ADACHI, A.; WATANABE, Y.; TAKAMATSU, N.; OKADA, Y. Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, Tm-1. **EMBO Journal**, v. 7, p. 1575-1581, 1988.

MESHI, T.; MOTOYOSHI, F.; MAEDA, T.; YOSHIWOKA, S.; WATANABE, H.; OKADA, Y. Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kDa protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. **Plant Cell**, v. 1, p. 515-522, 1989.

MILNE, R. An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in sections of infected cells and in negative stain preparations. **Journal of General Virology**, v. 6, p. 267-276, 1970.

MITTLER, R.; LAM, E. Sacrifice in the face of foes: Pathogen-induced programmed cell death in plants. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 10-15, 1996.

MITTLER, R.; SHULAEV, V.; LAM, E. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. **Plant Cell**, v. 7, p. 29-42, 1995.

MLEJNEK, P.; PROCHAZKA, S. Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. **Planta**, v. 215, p. 158-166, 2002.

MOHAMED, N. A.; RANGLES, J. W.; FRANCKI, R. I. B. Protein composition of tomato spotted wilt virus. **Virology**, v. 56, p. 12-21, 1973.

MORAES, G. J., WANDERLEY, L. J.; COSTA, A. S. Surto de vira-cabeça na cultura de alface em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, v. 6, p. 24-25, 1986.

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.

MOROZOV, S. YU; GORBULEV, V. G.; NOVIKOV, V. K.; AGRANOVSKII, A. A. A.; KOZLOV, YU V.; ATABEKOV, J. G.; BAEV, A. A. Primary structure of 5'- and 3'-terminal regions of the Potato virus X genomic RNA. **Dokl. Akad. Nauk SSSR**, v. 259, p. 723-725, 1981.

MOURY, B.; PALLOIX, A.; SELASSIE-GEBRE, K.; MARCHOUX, G. Hypersensitive resistance to tomato spotted wilt virus in three *Capsicum chinense* accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. **Euphytica**, v. 94, p. 45-52, 1997.

NAGAI, H.; MELO, A. M. T.; NARDO, E. A. B.; LOURENÇÃO, A. L. Comparação de inseticidas, extratos de plantas e óleo vegetal no controle do vírus de vira-cabeça do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.10, p. 104-106, 1992.

NAGATA, T.; ALMEIDA, A. C. L.; RESENDE, R. O. ; DE ÁVILA, A. C. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, v. 53, 136-140, 2004.

NAGATA, T.; BOITEUX, L. S.; IIZUKA, N.; DUSI, A. N. Identification of phenotypic variation of Tospovirus isolates in Brazil based on serological analysis and differential host response. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 425-430, 1993.

NAGATA, T.; DE ÁVILA, A. C.; DE TAVARES, P. C. T.; BARBOSA, C. DE J.; JULIATTI, F. C.; KITAJIMA, E. W. Occurrence of different tospoviruses in six states of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 90-95, 1995.

NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A. K.; PRINS, M.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Impeded thrips transmission of defective *Tomato spotted wilt virus* isolates. **Phytopathology**, v. 90, p. 454-459, 2000.

NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A. K.; SMID, H. M.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 507-515, 1999a.

NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A. K.; VAN LENT, J.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Factors determining vector competence and specificity for transmission of Tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 663-671, 2002.

NAGATA, T.; MOUND, L. A.; FRANCA, F. H.; de ÁVILA, A. C. 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.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, H.; INOUE-NAGATA, A. K.; DE ÁVILA, A. C. 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.

NAIDU, R. A.; INGLE, C. J.; DEOM, C. M.; SHERWOOD, J. L. The two envelope membrane glycoproteins of Tomato spotted wilt virus show differences in lectin-binding properties and sensitivities to glycosidases. **Virology**, v. 319, p. 107-117, 2004.

NORONHA, A. B.; DUARTE, L. M. L.; ALEXANDRE, M. A. V.; VICENTE, M. Inhibition of tomato spotted wilt virus (TSWV) systemic infection in tomato plants by *Cariophyllales* extracts. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p. 283-287, 1989.

NUEZ, F.; DIEZ, M. J.; ROSELLO, S.; LACASA, A.; JORDA, C.; MARTIN, M.; COSTA, J. Genetic resistance to TSWV (tomato spotted wilt virus) in *Capsicum* spp. **Capsicum Newsletter**, v. 13, p. 86-87, 1994.

ORMAN, B. E.; CELNIK, R. M.; MANDEL, A. M.; TORRES, H. N.; MENTABERRY, A. N. Complete cDNA sequence of a South American isolate of Potato virus X. **Virus Research**, v. 16, p. 293-306, 1990.

PADGETT, H. S.; WATANABE, Y.; BEACHY, R. N. Identification of the TMV replicase sequence that activates the *N* gene-mediated hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 709-715, 1997.

PAPPU, S. S.; BHAT, A. I.; PAPPU, H. R.; DEOM, C. M.; CULBREATH, A. K. Phylogenetic studies of tospoviruses (family: Bunyaviridae) based on intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. **Archives of Virology**, v. 145, p. 1035-1045, 2000.

PARDIGON, N.; VIALAT, P.; GERBAUD, S.; GIRARD, M.; BOULOY, M. Nucleotide sequence of the M segment of Germiston virus: comparison of the M gene product of several bunyaviruses. **Virus Research**, v. 11, p. 73-85, 1988.

PARRELA, G.; GOGNALONS, P.; GEBRE-SELASSIË; VOVLAS, C.; MARCHOUX, G. An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. **Journal of Plant Pathology**, v. 85, p. 227-264, 2003.

PARRELA, M. P.; MURPHY, B. C. Development of IPM strategies for western flower thrips attacking floriculture crops in protected culture. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS OF FLORAL AND VEGETABLE CROPS. Programs and abstracts, 1995, Taichung, Taiwan. Taichung: AVRDC, 1995, p. 36.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de Fitopatologia**. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 2, p. 417-452.

PATERSON, R. G.; SCOTT, S. J.; GERGERICH, R. C. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. **Euphytica**, v. 43, p. 173-178, 1989.

PERSSON, R.; PETTERSSON, R. F. Formation and intracellular transport of a heterodimeric viral spike protein complex. **Journal of Cell Biology**, v. 112, p. 257-266, 1991.

PESONEN, M.; KUISMANEN, E.; PETTERSSON, R. F. Monosaccharide sequence of protein-bound glycans of Uukuniemi virus. **Journal of Virology**, v. 41, p. 390-400, 1982.

PETERS, D. An updated list of plant species susceptible to tospoviruses. In: Peters, D. and Goldbach, R. (Eds.). **Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research**. Wageningen, The Netherlands, 1998. p. 107-110.

PETERS, D.; DE ÁVILA A. C.; KITAJIMA, E. W.; RESENDE, R. O.; DE HAAN, P.; GOLDBACH, R. An overview of tomato spotted wilt virus. In: PROCEEDINGS USDA WORKSHOP, 1990, Beltsville, USA. **Virus-thrips-plant interactions of tomato spotted wilt virus**. Beltsville, 1991, p. 1-14.

PETTERSSON, R.; SIMONS, J. F.; MELIN, L.; PERSSON, K.; RONNHOLM, R. Uukuniemi virus as a model for elucidating the molecular biology of bunyaviruses. In: Mahy, B. W.; Lvov., D. K. **Concepts in Virology from Ivanovsky to the present**. Harwood Academic, 1993. p. 309-319.

PITBLADO, R. E.; ALLEN, W. R.; MATTEONI, J. A.; GARTON, R.; SHIPP, J. L.; HUNT, D. W. A. Introduction of the tomato spotted wilt virus and western flower

thrips complex into field vegetables in Ontario, Canada. **Plant Disease**, v. 74, p. 81, 1990.

PITTMAN, H. A. Spotted wilt of tomatoes. Preliminary note concerning the transmission of the "spotted wilt" of tomatoes by an insect vector (*Thrips tabaci* Lind). **J. Aust. Counc. Sci. Ind. Res. Bull.**, v. 1, p. 74-77, 1927.

PONCHET, M.; PANABIÈRES, F.; MILAT, M. L.; MIKES, V.; MONTILLET, J. L.; SUTY, L.; TRIANTAPHYLIDES, C.; TIRILLY, Y.; BLEIN, J. P. Are elicitors cryptograms in plant-oomycete communication? **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 56, p. 1020-1047, 1999.

POZZER, L. **Caracterização e proposição de duas novas espécies no gênero *Tospovirus***. Tese de doutorado. 1998. 104 p. Universidade de Brasília, Brasil, 1998.

POZZER, L.; RESENDE, R. O.; LIMA, M. I.; GIORDANO, L. B.; ÁVILA, A. C. Tospovírus: uma visão atualizada. **Revisão Anual em Patologia de Plantas**, v. 4, p. 95-148, 1996.

PRINS, M. **Characterisation of tospovirus resistance in transgenic plants**. 1997. 130 p. PhD. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1997.

PRINS, M.; DE HAAN, P.; LUYTEN, R.; VAN VELLER, M.; VAN GRINSVEN, M. Q. J. M.; GOLDBACH, R. Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequences. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, p. 85-91, 1995.

PRINS, M.; GOLDBACH, R. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 31-35, 1998.

PRINS, M.; KIKKERT, M.; ISMAYADI, C.; DE GRAAUW, W.; DE HAAN, P.; GOLDBACH, R. Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants expressing NS<sub>M</sub> gene sequences. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 235-243, 1997.

PRINS, M.; RESENDE, R. O.; ANKER, C.; DE HAAN, P.; GOLDBACH, R. Engineered RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus is sequence specific. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 9, p. 416-418, 1996.

RAFF, M. Cell suicide for beginners. **Nature**, v. 396, p. 119-122, 1998.

REDDICK, B. B.; HADDEN, C. H.; BOST, S. C.; NEWMAN, M. A. First report of tomato spotted wilt virus in Tennessee. **Plant Disease**, v. 71, p. 376, 1987.

REDDY, D. V. R.; RATNA, A. S.; SUDARHANA, M. R.; POUL, F.; KUMAR, I. K. Serological relationships and purification of bud necrosis virus, a tospovirus occurring in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in India. **Annals of Applied Biology**, v. 120, p. 279-286, 1992.

REDDY, D. V. R.; SUDARHANA, M. R.; RATNA, A. S.; REDDY, A. S.; AMIN, P. W.; KUMAR, I. K.; MURTHY, A. K. The occurrence of yellow spot virus, a member of tomato spotted wilt virus group, on peanut (*Arachis hypogaea* L.) in India. In: PROCEEDINGS USDA WORKSHOP, 1990, Beltsville, USA. **Virus-thrips-plant interactions of tomato spotted wilt virus**. Beltsville, 1991, p. 77-78.

RESENDE, R. O. **Generation and characterization of mutants of tomato spotted wilt virus**. 1993. 113 p. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, The Netherlands, 1993.

RESENDE, R. O. Perspectivas de plantas transgênicas no controle de fitoviroses. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 123-152, 1994.

RESENDE, R. de O.; DE HAAN, P.; DE ÁVILA, A. C.; KITAJIMA, E. W.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2375-2383, 1991b.

RESENDE, R. O.; DE HAAN, P.; VAN DE VOSSEN, E.; DE ÁVILA, A. C.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Defective interfering LRNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2509-2516, 1992.

RESENDE, R. O.; KITAJIMA, E. W.; DE ÁVILA, A. C.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Defective isolates of tomato spotted wilt virus. In: PROCEEDINGS USDA WORKSHOP, 1990, Beltsville, USA. **Virus-thrips-plant interactions of tomato spotted wilt virus**. Beltsville, 1991a, p. 71-76.

RESENDE, R. O.; KORMELINK, R.; DE ÁVILA, A. C.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Accumulation of point mutations in the G2/G1 gene of envelope-deficient tospovirus isolates. **Journal of General Virology**, 1993.

RESENDE, R. O.; MARTINS, C.; SANTOS, M.; BEZERRA, I.; NAGATA, T.; PRINS, M.; DE ÁVILA, A. C. Diversity of the NSm movement protein among tospoviruses. In: **Proceedings of the International Symposium on Tospovirus and Thrips in Floral and Vegetable Crops**. Wageningen, The Netherlands. Wageningen, 1998. p. 38-40.

RESENDE, R. O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I. C.; LIMA, M. I.; GIORDANO, L.; KITAJIMA, E. W.; DE ÁVILA, A. C. New tospoviruses found in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 431, p. 78-89, 1996.

RODITAKIS, N. E.; LYKOURESSIS. Perspectives for the use of volatile chemicals and a new pyrrole AC 303,630 in IPM programs of western flower thrips. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS OF FLORAL AND VEGETABLE CROPS. Program and abstracts, 1995, Taichung, Taiwan. Taichung: AVRDC, 1995, p. 40.

ROGGERO, P.; DELLAVALLE, G.; CIUFFO, M.; PENNAZIO, S. Effects of temperature on infection in *Capsicum* spp. and *Nicotiana benthamiana* by impatiens necrotic spot tospovirus. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 509-512, 1999.

ROGGERO, P.; LISA, V.; NERVO, G.; PENNAZIO, S. Continuous high temperature can break the hypersensitivity of *Capsicum chinense* 'P1152225' to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). **Phytopathologia Mediterranea**, v. 35, p. 117-120, 1996.

ROGGERO, P.; MASENGA, V.; TAVELLA, L. 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.

ROSELLÒ, S.; DIEZ, M. J.; NUEZ, F. Utilization of *Capsicum* sp. Resistance to TSWV in pepper breeding. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 16, p.87-90, 1997.

ROSELLO, S.; JORDA, C.; NUEZ, F. El virus del bronceado del tomate (TSWV). I. Enfermedades y epidemiología. **Phytoma España**, v. 62, p. 21-34, 1994.

RUDOLPH, C.; SCHREIER, P.; UHRIG, J. F. Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.100, p. 4429-4434, 2003.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v. 238, p. 491-497, 1987.

RYERSON, D. E.; HEALTH, M. C.; WANG, H.; LI, J.; BOSTOCK, R. M.; GILCHRIST, D. G. DNA ladders connecting animals and plants. **Trends Plant Science**, v. 1, p. 212, 1996.

SAKIMURA, K. *Frankliniella fusca*, an additional vector for the tomato spotted wilt virus, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. **Phytopathology**, v. 53, p. 412-415, 1963.

SAKIMURA, K. **Biological transmission of agents**. In: Maramorosch, K. (ed). New York : Academic Press, 1962. p. 33-34.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2 ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMUEL, G.; BALD, J. G.; PITTMAN, H. A. Investigation on "spotted wilt" of tomatoes. Commonwealth of Australia, Council for Scientific and Industrial Research Bulletin 44, 64 p., 1930.

SATYANARAYANA, T.; LAKSHMINARAYANA REDDY, K.; RATNA, A. S.; DEOM, C. M.; GOWDA, S.; REDDY, D. V. R. Peanut yellow spot virus: a distinct tospovirus species based on serology and nucleic acid hybridisation. **Annals of Applied Biology**, v. 129, p. 237-245, 1996.

SCHNEEMANN, A.; SCHNEIDER, P. A.; KIM, S.; LIPKIN, W. I. Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. **Journal of Virology**, v. 68, p. 6514-6522, 1994.

SCHULTZ, J.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; PONTING, C.P.; BORK, P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 231-234, 2000.

SCHULTZ, J.; MILPETZ, F.; BORK, P.; PONTING, C.P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proceedings of National Academic Science of USA**, v. 95, p. 5857-5864, 1998.

SILBERSCHMIDT, K. M. A doença vira-cabeça do tomateiro. **O Biológico**, v. 3, p. 183-184, 1937.

SILVA, M. S.; MARTINS, C. R. F.; BEZERRA, I. C.; NAGATA, T.; DE ÁVILA, A.C.; RESENDE, R. O. Sequence diversity of NS<sub>M</sub> movement protein of tospoviruses. **Archives of Virology**, v. 146, p. 1267-1281, 2001.

SKRYABIN, K. G.; KRAEV, A. S.; MOROZOV, S. YU; ROSANOV, M. N.; CHERNOV, B. K.; LUKASHEVA, L. I.; ATABEKOV, J. G. Nucleotide sequence of Potato virus X RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 10929-10930, 1988.

SMITH, P. G. Reaction of *Lycopersicon* spp. to spotted wilt. **Phytopathology**, v. 34, p. 504-505, 1944.

SMITHBURN, K. C.; HADDOW, A. J.; MAHAFFY, A. F. Neurotropic virus isolated from *Aedes* mosquitoes caught in Semliki Forest. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 26, p. 189-208, 1946.

SOLER, S.; DIEZ, M. J.; NUEZ, F. Effects of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. **Plant Disease**, v. 82, p. 1199-1204, 1998.

SONENBERG, N.; SHATKIN, A. J.; RICCIARDI, R. P.; RUBIN, M.; GOODMAN, R. M. Analysis of terminal structures of RNA from Potato virus X. **Nucleic Acids Research**, v. 5, p. 2501-2512, 1978.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JONES, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, p. 661-667, 1995.

STEVENS, J. M. **Tomato breeding: Project Report W-Vvl**. Republic of South Africa: Dept. Agricultural Technical Services, 1964.

STEVENS, J. R.; SCOTT, S. J.; GERGERICH, R. C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, v. 59, p. 9-17, 1992.

STORMS, M. M. H. **The role of NS<sub>M</sub> during tomato spotted wilt virus infection**. 1998. 118 p. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1998.

SUN, Y. L.; ZHAO, Y.; HONG, X.; ZHAI, Z. H. Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. **FEBS Letter**, v. 462, p. 317-321, 1999.

SZITTYA, G.; BURGYÁN, J. Cymbidium ringspot tobusvirus coat protein coding sequence acts as an avirulent RNA. **Journal of Virology**, v. 75, p. 2411-2420, 2001.

TAKAMATSU, N.; ISHIKAWA, M.; MESHI, T.; OKADA, Y. Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. **EMBO Journal**, v. 6, p. 307-311, 1987.

TAKEDA, A.; SUGIYAMA, K.; NAGANO, H.; MORI, M.; KAIDO, M.; MISE, K.; TSUDA, S.; OKUNO, T. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. **FEBS Letter**, v. 532, p. 75-79, 2002.

TARAPOREWALA, Z. F.; CULVER, J. N. Identification of an elicitor active site within the three-dimensional structure of the tobacco mosaic tobamovirus coat protein. **Plant Cell**, v. 8, p. 169-178, 1996.

TAS, P. W. L.; BOERIAN, M. L.; PETERS, D. The structural proteins of tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 267-279, 1977.

TAVELLA, L.; ALMA, A.; CONTI, A.; ARZONE, A. Evaluation of the effectiveness of *Orius* spp. against *Frankliniella occidentalis* (Pergande). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS OF FLORAL AND VEGETABLE CROPS. Program and abstracts, 1995, Taichung, Taiwan. Taichung: AVRDC, 1995, p. 16.

THOMAS, C. L.; JONES, L.; BAULCOMBE, D. C.; MAULE, A. J. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-mediated methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. **Plant Journal**, v. 25, p. 417-425, 2001.

ULLMAN, D. E.; CHO, J.; MAU, R.; HUNTER, W.; WESTCOT, D.; CUSTER, D. Thrips-tomato spotted wilt virus interactions: morphological, behavioural and cellular components influencing thrips transmission. **Advances in Disease Vector Research**, v. 9, p. 195-240, 1992a.

ULLMAN, D. E.; CHO, J. J.; MAU, R. F. L.; WESTCOT, D. M.; CUSTER, D. M. Midgut epithelial cells act as a barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. **Phytopathology**, v. 82, p. 1333-1342, 1992b.

ULLMAN, D. E.; GERMAN, T.; SHERWOOD, J. L.; WESTCOT, D. M.; CANTONE, F. Tospovirus replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the non-structural 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.; SHERWOOD, J. L.; GERMAN, T. Thrips as vectors of plant pathogens. In: Lewis, T. (Ed.). **Thrips as Crop Pests**. Cab International, 1997. p. 539-565.

ULLMAN, D. E.; WESTCOT, D. M.; CHENAULT, K. D.; SHERWOOD, J. L.; GERMAN, T.; BANDLA, M. D.; CANTONE, F.; DUER, H. Compartmentalization, intracellular transport, and autophagy of tomato spotted wilt tospovirus proteins in infected thrips cells. **Phytopathology**, v. 85, p. 644-654, 1995.

ULTZEN, T.; GIELEN, J. J. L.; VENEMA, F.; WESTERBROEK, A.; DE HAAN, P.; TAN, M. L.; SCHRAM, A.; VAN GRINSVEN, M. Q. J. M.; GOLDBACH, R. Resistance to tomato spotted wilt virus in tomato hybrids. **Euphytica**, v. 85, p. 159-168, 1995.

UREN, A. G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L. A.; PISABARRO, M. T.; SESHAGIRI, S.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. V. Identification of para-caspases 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.

VAIRA, A.; ROGGERO, P.; LUISIONI, E.; MASENGA, V.; MILNE, R. G.; LISA, V. Characterization of two tospoviruses in Italy: tomato spotted wilt virus and impatiens necrotic spot. **Plant Pathology**, v. 42, p. 530-542, 1993.

VAN DEN HURK, J.; TAS, P. W. L.; PETERS, D. The ribonucleic acid of tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 81-91, 1977.

VAN KAMMEN, A.; HENSTRA, S.; IE, T. S. Morphology of tomato spotted wilt virus. *Virology*, v. 30, p. 574-577, 1966.

VAN KNIPPENBERG, I.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, R. Purified tomato spotted wilt virus particles support both genome replication and transcription in vitro. *Virology*, v. 303, p. 278-286, 2002.

VAN POELWIJK, F.; BOYE, K.; OOSTERLING, R.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Detection of the L protein of tomato spotted wilt virus. *Virology*, v. 197, p. 468-470, 1993.

VAN POELWIJK, F.; KIKKERT, M.; PRINS, M.; KORMELINK, R.; STORMS, M.; VAN LENT, J.; PETERS, D.; GOLDBACH, R.; DE HAAN, P. Replication and expression of the tospoviral genome. Proceedings of the International Symposium on Tospoviruses and Thrips of Floral and Vegetable Crops. *Acta Horticulturae*, v. 431, p. 201-208, 1996.

VAN POELWIJK, F.; PRINS, M.; GOLDBACH, R. Completion of the Impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family *Bunyaviridae*. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 543-546, 1997.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Virus species, a much overlooked but essential concept for virus classification. *Intervirology*, v. 31, p. 241-254, 1990.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Springer, Wien,, 2000.

VAN ZIJL, J. J. B.; BOCH, W. E.; COETZEE, C. P. J. Breeding tomatoes for processing in South Africa. *Acta Horticulturae*, v. 194, p. 69-75, 1986.

VERKLEIJ, F.; DE VRIES, P.; PETERS, D. Evidence that tomato spotted wilt virus RNA is a positive strand. *Journal of General Virology*, v. 58, p. 329-338, 1982.

VERKLEIJ, F.; PETERS, D. Characterization of a defective form of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, v. 64, p. 677-682, 1983.

WARD, A.; ETESSAMI, P.; STANLEY, J. Expression of a bacterial gene in plants mediated by infectious geminivirus DNA. *EMBO Journal*, v. 7, p. 1583-1587, 1988.

WEBER, H.; PFITZNER, A. J. Tm-22 resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of tomato mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 11, p. 498-503, 1998.

WEBER, H.; SCHULTZER, S.; PFITZNER, A. J. 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. *Journal of Virology*, v. 67, p. 6432-6438, 1993.

WHITE, J. M. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annual Review of Physiology*, v. 52, p. 675-697, 1990.

WIJKAMP, I. **Virus-vector relationship in the transmission of tospoviruses.** 1995. 141 p. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1995.

WIJKAMP, I.; ALMARZA, N.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology*, v. 85, p. 1069-1074, 1995.

WIJKAMP, I.; PETERS, D. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology*, v. 83, p. 986-991, 1993.

WIJKAMP, I.; VAN LENT, J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 341-349, 1993.

WILSON, T. M. A. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 90, p. 3134-3141, 1993.

WOLTERING, E. J.; VAN DER BENT, A.; HOEBERICHTS, F. A. Do plant caspases exist? *Plant Physiology*, v. 130, p. 1764-1769, 2002.

YEH, S-D.; CHANG, T-F. Nucleotide sequence of the N gene of watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. *Phytopathology*, v. 85, p. 58-64, 1995.

YEH, S-D.; LIN, Y.; CHENG, Y.; JIH, C.; CHEN, M.; CHEN, C. Identification of tomato spotted wilt virus on watermelon in Taiwan. *Plant Disease*, v. 76, p. 835-840, 1992.

ZAVALETA-MEJÍA, E.; OCHOA, D.; CERVANTES-DÍAZ, L.; JOHANSEN, R. M. Tospovirus, weeds, and thrips associated with chrysanthemum (*Dendranthema glandiflora*) cv. "polaris" and management attempts. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS OF FLORAL AND VEGETABLE CROPS. Programs and abstracts, 1995, Taichung, Taiwan. Taichung: AVRDC, 1995, p. 56.