

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) em alface e novas  
hospedeiras: Identificação de genes de suscetibilidade via análise  
transcritômica, busca por novas fontes de resistência natural e mobilização  
do gene de resistência *Sw-5b* do tomateiro para a alface via transgenia**

**TIAGO SILVA JORGE**

**BRASÍLIA**  
**DISTRITO FEDERAL – BRASIL**  
**2023**

**TIAGO SILVA JORGE**

**Groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) em alface e novas hospedeiras: Identificação de genes de suscetibilidade via análise transcritômica, busca por novas fontes de resistência natural e mobilização do gene de resistência *Sw-5b* do tomateiro para a alface via transgenia**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Orientador**

Leonardo Silva Boiteux, Ph.D.

**BRASÍLIA**  
**DISTRITO FEDERAL – BRASIL**  
**2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda minha família e amigos por seu apoio incondicional durante toda minha jornada profissional que, mesmo na saudade, sempre me receberam e forneceram os mais belos sorrisos e palavras em cada reencontro. Obrigado por tudo!

À minha amada mamãe Regina e ao meu pai Antônio pela oportunidade de nascer, crescer e de fornecerem, mesmo em sua corriqueira necessidade, todo o apoio para a conclusão dessa jornada profissional. Obrigado por tudo!

À minha irmã Bruna, sendo responsável por uma das mais fortes lembranças desse doutorado, ao me lembrar de seus olhos marejados de felicidade após a minha aprovação no Doutorado na Universidade de Brasília. Obrigado por tudo!

À minha companheira Nayana, pelo apoio incondicional, pelo amor, companheirismo e auxílio prestado em todos os momentos desta jornada, que foram de suma importância para a conclusão dessa jornada. Obrigado por tudo!

Aos meus familiares Wesley, Antonio e Auxiliadora, por me fornecerem sua morada durante toda a minha estadia em Brasília. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos da Universidade de Brasília, do Laboratório de Virologia Vegetal, do Laboratório de Fitopatologia e Laboratório de Melhoramento/Genômica da Embrapa Hortaliças, pelo auxílio na condução de todas as atividades relacionadas a tese. Ressalto que o mais importante agradecimento é pela rotina saudável de companheirismo e amizade, gerando lembranças que levarei comigo para o resto da vida. Obrigado por tudo!

Ao meu orientador Dr. Leonardo Silva Boiteux, que se tornou uma das pessoas que mais admiro. Professor, seu entusiasmo, humildade, educação e brilhantismo foram, sem dúvidas, uns dos principais fatores que me moveram a sempre me dedicar ao máximo. Obrigado por tudo!

A minha orientadora Dra. Maria Esther, que também se tornou uma das pessoas que mais admiro. Dra. Maria Esther, durante minha jornada nunca encontrei alguém que tivesse um poder

de resolução de problemas tão brilhante quanto a senhora, seus ensinamentos, sem dúvidas, caminharão comigo pelo resto de minha vida. Agradeço também por todo o apoio fornecido para a conclusão dessa tese. Obrigado por tudo!

A minha orientadora Dra. Mirtes Lima, por me introduzir ao mundo da virologia vegetal, por me ensinar toda a metodologia empregada na condução dos trabalhos, e pelo acesso ao laboratório de virologia da Embrapa Hortaliças. Obrigado por tudo!

A toda a equipe de funcionários da Embrapa Hortaliças Chico, Getúlio, Maria, Ronan, Claudemir, Willian e Lúcio. Foi graças a disponibilidade de cada um de vocês que todos os trabalhos foram conduzidos com muita dedicação. Obrigado por tudo!

A todas as agências de fomento envolvidas na conclusão dessa tese, CNPq, FAP-DF e CAPES.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	9
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	10
<b>CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: A ALFACE (<i>Lactuca sativa</i> L.) E AS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Orthospovirus</i> ASSOCIADAS COM A CULTURA</b> .....	11
Aspectos gerais da cultura da alface.....	12
Gênero <i>Orthospovirus</i> .....	14
Importância econômica e histórico da doença vira-cabeça.....	14
Taxonomia.....	15
Etiologia .....	16
Sintomatologia .....	18
Epidemiologia .....	20
Processo de infecção dos orthospovirus.....	23
Estratégias de controle do ‘vira-cabeça’ no cultivo da alface.....	24
Mecanismos de resistência contra a infecção viral .....	24
Histórico e panorama atual do melhoramento genético da alface visando a resistência a orthospovirus.....	26
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	27
<b>CAPÍTULO 2 CLASSICAL AND BIOTECHNOLOGICAL BREEDING OF TOMATO, <i>Capsicum</i>, AND LETTUCE FOR RESISTANCE TO ORTHOSP VIRUSES IN BRAZIL</b> .....	34
<b>ABSTRACT</b> .....	36
<b>INTRODUCTION</b> .....	37
Loss-of-susceptibility mutations .....	41
Marker-assisted selection (MAS), isolation, and structural features of virus resistance genes in plants .....	41
The genus <i>Orthospovirus</i> .....	42
Taxonomic criteria and diversity of the orthospoviruses .....	42
Symptoms induced by orthospoviruses.....	43
Vectors and epidemiology of the orthospoviruses .....	44
Advances in horticultural plant breeding for resistance to orthospovirus-induced diseases .....	44
<b>Tomato breeding for resistance to <i>Orthospovirus</i> species</b> .....	45
Resistance to <i>Orthospovirus</i> species in tomatoes.....	45
Mechanisms of GRSV pathogenesis in tomatoes .....	46
MAS for the Sw-5b gene in tomato breeding.....	46
<b><i>Capsicum</i> breeding for resistance to <i>Orthospovirus</i></b> .....	47

Breeding programs for Capsicum resistance to orthotospovirus .....	47
Isolation and marker-assisted selection (MAS) of the <i>Tsw</i> gene in <i>Capsicum</i> .....	48
<i>Tsw</i> -resistance breaking viral species and isolates .....	48
<b>Lettuce breeding for resistance to <i>Orthotospovirus</i></b> .....	48
Classical breeding for <i>Orthotospovirus</i> resistance in lettuce .....	48
Lettuce breeding for <i>Orthotospovirus</i> resistance in Brazil .....	49
Potential application of transcriptomic analyses to study the interactions of GRSV and TSWV with lettuce cultivars .....	50
<b>Biotech breeding strategies for controlling <i>Orthotospovirus</i>-induced diseases.</b> .....	50
Transgenic approaches .....	50
RNA gene silencing or RNAi.....	50
Cisgenic strategy .....	51
Generation of loss-of-susceptibility mutations for control of orthotospoviruses.....	51
<b>FINAL CONSIDERATIONS</b> .....	52
<b>REFERENCES</b> .....	53
<b>CAPÍTULO 3 ENSAIOS DE CAMPO COM EXPOSIÇÃO NATURAL AO VETOR E TESTES DE TRANSMISSÃO MECÂNICA EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA DETECÇÃO DE FONTES ESTÁVEIS DE RESISTÊNCIA A ORTHOTOSPOVIRUS EM GERMOPLASMA DE <i>Lactuca</i>.</b> .....	65
<b>RESUMO</b> .....	67
<b>ABSTRACT</b> .....	68
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	69
<b>MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....	72
Ensaio de campo.....	72
Produção das mudas e montagem do experimento .....	72
Avaliação do experimento de campo e análise estatística.....	73
Experimentos de casa de vegetação .....	73
Produção do inóculo, inoculação e avaliação em condições de casa de vegetação .....	74
Análise estatística .....	75
<b>RESULTADOS</b> .....	75
Seleção dos acessos com menores níveis de incidência em condições de inoculo natural em campo .....	75
Avaliação através de bioensaios inoculação mecânica com isolados de GRSV e TSWV em casa de vegetação dos acessos de <i>Lactuca</i> mais promissores em condições de campo...	76
Divergência genética em resposta a inoculação com diferentes isolados de orthotospovirus em condições controladas.....	76
<b>DISCUSSÃO</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81

<b>CAPÍTULO 4 DINÂMICA DA REPLICAÇÃO VIRAL AVALIADA VIA qPCR E ANÁLISE TRANSCRITÔMICA DA INTERAÇÃO COMPATÍVEL ENTRE GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV) E <i>Lactuca sativa</i> ‘SALINAS’</b> .....	93
<b>RESUMO</b> .....	95
<b>ABSTRACT</b> .....	96
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	97
<b>MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....	100
Local de realização dos experimentos de Real-time PCR (qPCR) e bioensaios.....	100
Caracterização e preparo do inóculo para os bioensaios .....	100
Preparo de mudas, montagem dos bioensaios e amostragem para transcrito.....	101
Análise transcritômica.....	102
Avaliação visual e sorológica via dot-ELISA e confirmação da infecção por um isolado de GRSV .....	102
Extração de RNA total de plantas sintomáticas e positivas no teste dot-ELISA.....	103
Determinação do período ótimo para a confecção do transcrito via qPCR.....	104
Construção das bibliotecas de transcritos.....	106
Análise de bioinformática dos dados de RNAseq: Alinhamento com genoma de referência e anotação manual .....	106
Dinâmica da replicação viral e seleção do período para a análise transcritômica .....	107
Mapeamento de reads e análise de genes diferencialmente expressos na interação compatível entre GRSV e a cultivar ‘Salinas’ .....	108
<b>DISCUSSÃO</b> .....	110
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	116
<b>CAPÍTULO 5 EXPRESSÃO DO GENE <i>Sw-5b</i> DO TOMATEIRO EM ALFACE E REAÇÃO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS A UM ISOLADO DE GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV)</b> .....	137
<b>RESUMO</b> .....	139
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	141
<b>MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....	144
Plantas de alface geneticamente modificadas com o gene <i>Sw-5b</i> .....	144
Preparo de mudas e condução do experimento .....	144
Produção do inóculo e inoculação mecânica.....	145
Avaliação visual e confirmação de plantas sintomáticas via sorologia .....	145
Coleta, extração de DNA e PCR .....	146
Extração de RNA e RT-PCR.....	146
Confirmação da presença do RNA de <i>Sw-5b</i> nos eventos transgênicos de alface.....	147
<b>RESULTADOS</b> .....	147
Confirmação da porcentagem de eventos transgênicos em gerações segregantes .....	147

Reação fenotípica de eventos transgênicos ao desafio com GRSV: Porcentagem de plantas infectadas confirmadas por avaliação visual e teste sorológico dot-ELISA .....	148
Confirmação da expressão do gene <i>Sw-5b</i> em um subgrupo de plantas de alface sintomáticas e assintomáticas.....	148
<b>DISCUSSÃO</b> .....	149
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	153
<b>CAPÍTULO 6 NOVAS ESPÉCIES HOSPEDEIRAS EXPERIMENTAIS E BUSCA POR FONTES DE RESISTÊNCIA AO GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV) EM GERMOPLASMA DE <i>Solanum</i> (SUBGÊNERO <i>Leptostemonum</i>).....</b>	<b>170</b>
<b>RESUMO</b> .....	172
<b>ABSTRACT</b> .....	173
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	174
<b>MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....	176
Material vegetal.....	176
Produção das mudas e estabelecimento do bioensaio .....	176
Produção do inóculo, inoculação e avaliação da incidência via teste dot-ELISA .....	177
<b>RESULTADOS</b> .....	177
<b>DISCUSSÃO</b> .....	178
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	180
<b>CAPÍTULO 7 CONFIRMATION OF GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV) INFECTION IN EGGPLANT CULTIVARS IN BRAZIL.....</b>	<b>186</b>
<b>CAPÍTULO 8 NATURAL INFECTION OF <i>Cichorium intybus</i> (ASTERACEAE) BY GROUNDNUT RINGSPOT VIRUS (GENUS ORTHOTOSPOVIRUS) ISOLATES IN BRAZIL.....</b>	<b>191</b>
<b>CAPÍTULO 9 FIRST REPORT OF <i>Cichorium endivia</i> (ASTERACEAE) AS A NATURAL HOST OF GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS IN BRAZIL .....</b>	<b>195</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	201



## RESUMO GERAL

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das principais hortaliças folhosas no mundo. As doenças causadas por isolados de diferentes espécies do gênero *Orthotospovirus*, incluindo a espécie *Orthotospovirus arachianuali* (GRSV) e *Orthotospovirus tomatomaculae* (TSWV) estão entre as mais importantes desta hortaliça. GRSV é a espécie viral predominante no Brasil e, até o presente momento, não estão disponíveis cultivares de alface com níveis adequados de resistência a esse patógeno. A presente tese foi organizada em nove capítulos. Os capítulos **I & II** apresentam uma revisão sobre os orthotospovirus e os avanços obtidos através do melhoramento clássico e biotecnológico visando resistência a esses patógenos nas culturas da alface, *Capsicum* e tomateiro. No capítulo **III**, foram conduzidos experimentos visando identificar fontes naturais de resistência genética aos orthotospovirus em germoplasma de alface cultivada e de espécies silvestres. Sessenta e cinco (65) acessos de *Lactuca* foram avaliados inicialmente em condições de inóculo natural. Onze acessos (apresentando baixas incidências de plantas com sintomas) foram selecionados para os ensaios em casa de vegetação via inoculação mecânica. Cinco isolados de diferentes de orthotospovirus (três isolados de GRSV e dois isolados de TSWV) foram utilizados. Três acessos avaliados apresentaram valores de baixa taxa de infecção viral. Nenhum acesso apresentou respostas do tipo imunidade. Este é o primeiro estudo identificando fontes de tolerância genética ao GRSV. No capítulo **IV**, uma análise transcritômica foi conduzida visando identificar genes diferencialmente expressos entre plantas inoculadas e não inoculadas durante a interação entre a cultivar suscetível ‘Salinas’ e um isolado de GRSV. O RNA total das plantas foi coletado em cinco períodos após a inoculação (1 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias). A dinâmica da replicação viral ao longo dos diferentes períodos foi determinada via PCR em tempo real (qPCR). O tempo mais adequado para análise transcritômica foi o de 48 horas após inoculação, quando ocorreu o início da multiplicação viral nos tecidos foliares hospedeiros. As amostras então foram submetidas ao processo de RNA-seq. Foram caracterizados 273 genes diferencialmente expressos nos contrastes entre plantas inoculadas versus não-inoculadas, incluindo diferentes categorias de funções gênicas relacionadas com processos de defesa de planta durante a infecção com vírus. No capítulo **V**, eventos transgênicos de alface contendo o gene de resistência *Sw-5b* do tomateiro foram desafiados em condições controladas de inoculação com um isolado de GRSV. Os eventos foram avaliados através da via análises visuais e sorológicas com posterior extração de ácidos nucleicos e PCR com primers específicos. Análises também foram conduzidas visando confirmar inserção genômica do gene *Sw-5b* e a presença de seus transcritos em tecido foliar de alface. As plantas transformadas com o gene *Sw-5b* apresentaram elevada suscetibilidade, com algumas poucas plantas assintomáticas. O produto gênico do *Sw-5b* e seu transcrito foram detectados tanto em plantas sintomáticas quanto em assintomáticas, indicando que a transferência do gene *Sw-5b* isoladamente não foi suficiente para conferir resistência ao GRSV em alface. Nos capítulos **VI, VII, VIII & IX** foram identificadas novas hospedeiras naturais e experimentais de GRSV. Três culturas foram relatadas como novas hospedeiras naturais, incluindo a chicória (*Cichorium endivia*), o almeirão (*C. intybus*) e a berinjela (*Solanum melongena*). Trinta acessos do banco ativo de jurubebas (*Solanum* subgênero *Leptostemonum*) foram desafiados com GRSV visando detectar fontes de resistência e/ou novas hospedeiras experimentais. Todos os acessos se mostraram suscetíveis. Foram relatadas como novas hospedeiras acessos de *S. macrocarpon*, *S. acanthodes*, *S. viarum*, *S. subinerme*, *S. stramonifolium* e *S. sisymbriifolium*. Em resumo, a presente tese fornece novas informações para estabelecer estratégias mais eficazes de melhoramento genético e de manejo de doenças induzidas por orthotospovirus em alface e outras plantas hospedeiras.

**Palavras-chave:** GRSV, *Lactuca sativa* L., vira-cabeça.

## GENERAL ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the main leafy vegetables worldwide. Diseases caused by a complex of *Orthotospovirus* species (including *Orthotospovirus arachianuli* – GRSV and *Orthotospovirus tomatomaculæ* – TSWV) are among the most important of this vegetable. GRSV is the predominant viral species in Brazil and, up to now, lettuce cultivars with adequate levels of resistance are not available. This thesis was organized into nine chapters. Chapters **I** & **II** present a review of this viral complex and the advances obtained through classical and biotechnological resistance breeding to orthotospoviruses in lettuce, *Capsicum*, and tomato crops. In Chapter **III**, experiments were conducted to identify new natural sources of genetic resistance to orthotospoviruses in germplasm of cultivated and wild lettuce species. Sixty-five (65) *Lactuca* accessions were initially evaluated under field (natural) inoculum conditions. Eleven accessions (displaying low incidence of symptoms) were selected for greenhouse trials via mechanical inoculation. Five different orthotospovirus isolates (three GRSV isolates and two TSWV isolates) were used. Three evaluated accessions ('Bedford', 'Belissimo', and 'UC12100') showed low values of viral incidence (= high tolerance levels). No accessions showed immunity-like responses. This is the first study identifying sources of genetic tolerance to GRSV. In chapter **IV**, a transcriptomic analysis was conducted to identify genes differentially expressed across inoculated versus non-inoculated lettuce plants during the interaction between the susceptible cultivar 'Salinas' and a GRSV isolate. The total RNA of the plants was collected in five periods after inoculation (1 hour, 6 hours, 24 hours, 48 hours, and 7 days). The dynamics of viral replication over different times was determined via real-time PCR. The best time for transcriptomic analysis was identified at 48 hours after inoculation, when viral multiplication in the host tissues was initiated. The samples were then submitted to the RNA-seq. A total of 273 genes was found to be differentially expressed in the contrasts between inoculated versus non-inoculated plants, including different categories of gene functions. In chapter **V**, cisgenic lettuce events containing the tomato *Sw-5b* resistance gene were challenged under controlled inoculation conditions with a GRSV isolate. The evaluation was carried out via visual assessment of the symptoms and via serological analysis with subsequent nucleic acid extraction and PCR assays with virus-specific primers. The genomic insertion of the *Sw-5b* gene and the presence of its transcripts were also evaluated in leaf tissues. Plants transformed with the *Sw-5b* gene showed high susceptibility to GRSV, with low number of asymptomatic plants. The *Sw-5b* gene product and its transcripts were detected in both symptomatic and asymptomatic plants, indicating that the transfer of this gene alone was not effective to provide resistance to GRSV in lettuce. In chapters **VI**, **VII**, **VIII**, & **IX** new natural and experimental host species of GRSV were identified. Three crops have been reported as new natural hosts, including *Cichorium endivia*, *C. intybus*, and eggplant (*Solanum melongena*). Thirty accessions from the germplasm bank of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* were challenged with a GRSV isolate to identify new potential sources of resistance and experimental hosts. All accessions were susceptible. Accessions of *S. macrocarpon*, *S. acanthodes*, *S. viarum*, *S. subinerme*, *S. scuticum*, *S. stramonifolium*, and *S. sisymbriifolium* were reported as new experimental hosts of GRSV. In conclusion, the present thesis provides new information that will help to establish more effective breeding and management strategies of diseases induced by orthotospoviruses in lettuce and other host crops.

**Keywords:** GRSV, *Lactuca sativa* L., spotted wilt disease

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:**

#### **A ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E AS ESPÉCIES DO GÊNERO *Orthospovirus* ASSOCIADAS COM A CULTURA**

### **Aspectos gerais da cultura da alface.**

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das principais hortaliças folhosas cultivadas no mundo, gerando sustento para produtores dos diferentes segmentos varietais. Essa hortaliça é principalmente consumida *in natura* na forma de saladas, na indústria de *fastfoods*, e na forma de produtos nutracêuticos. Constitui-se de uma potencial fonte de fibras, ferro, folato e vitamina C. Além do aspecto nutricional, a alface ainda demonstra potencial anti-inflamatório, bem como auxilia no combate a diabetes e colesterol alto (Moo et al., 2016).

Pertence à família Asteraceae, sendo a família botânica com o maior número de espécies caracterizadas e aceitas, comportando aproximadamente 30.000 espécies (Funk et al., 2009). A alface cultivada é uma planta diploide ( $2x=2n=18$  cromossomos), estritamente autógama, pertencente a subfamília Cichorioideae, tribo Cichorieae e gênero *Lactuca*, o qual comporta mais de 100 espécies. Dentro do gênero *Lactuca* L., apenas acessos das espécies *Lactuca sativa* L., *Lactuca saligna* L., *Lactuca serriola* L. e *Lactuca virosa* L. se encontram relatadas em esforços para incorporação de caracteres agrônômicos em programas de melhoramento de alface. Problemas quanto a obtenção de indivíduos férteis a partir de cruzamentos interespecíficos são recorrentes, sendo progênies obtidas a partir do cruzamento entre *L. sativa* e *L. serriola* completamente férteis (Ryder, 1986; de Vries, 1997).

Diferentes hipóteses indicam como centro de origem e domesticação da alface a região do Mediterrâneo, com relatos dos primeiros cultivos em torno de 2.500 a.C no Egito, indicando a espécie *L. serriola* como o mais provável parental ancestral da alface cultivada. A cultura foi rapidamente disseminada ao longo da Europa pelo avanço do Império Romano, sendo cultivada em locais como a Grécia e Roma. No século XV, a alface foi levada para a América pelo navegador Cristóvão Colombo (Ryder, 1986; Davis et al., 1997; de Vries, 1997). No Brasil, o

primeiro relato de introdução da alface ocorreu durante o século XVI, através de expedições de imigrantes portugueses (Filgueira, 2008). Desde os primórdios de sua domesticação, diferentes morfotipos de alface foram obtidos com melhor adaptação às diferentes condições edafoclimáticas, sistemas de cultivo e, principalmente, a preferência do mercado consumidor.

No ano de 2020, a produção mundial de alface e chicórias foi estimada em 31 milhões de toneladas, sendo a China responsável por aproximadamente 65% da produção, seguida por Estados Unidos e Índia (FAOSTAT, 2022). No Brasil, a alface é a hortaliça mais consumida e a segunda mais produzida (atrás apenas da cultura do tomateiro), estando presente em mais de 108.000 propriedades, com produção em torno de 671 mil toneladas, (IBGE, 2019). São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Minas Gerais são os principais estados produtores brasileiros. Diferentes sistemas de cultivos são empregados na produção da alface de acordo com a cultivar e manejo adotados. No Brasil, os sistemas mais utilizados são o cultivo convencional, o cultivo protegido em sistema hidropônico ou diretamente no solo, e o cultivo orgânico em campo aberto ou protegido (Filgueira, 2008; Echer et al. 2016). A demanda por esta hortaliça é diversificada, liderada pelo morfotipo ‘Crespa’, seguida pelo morfotipo ‘Americana’ (‘Iceberg’) que tem sido consumida principalmente na indústria de fastfoods (Costa & Sala, 2005; Sala & Costa, 2012). Outros morfotipos são encontrados nas diferentes regiões produtoras no mundo, incluindo ‘Aspargo’ (‘Stem’), ‘Lisa’ (‘Butterhead’), ‘Romana’ (‘Cos’ ou ‘Romaine’), ‘Oleaginosa’ (‘Oilseed’), ‘Mimosa’ e ‘Frisée’ (Ryder, 1999, Filgueira, 2008). De forma geral, os cultivos de alface são conduzidos na proximidade de grandes centros de comercialização e consumo devido à alta demanda do produto e elevada perecibilidade durante o armazenamento e transporte.

Diversos agentes etiológicos como fungos, bactérias, vírus, nematoides, fitoplasmas e plantas parasitárias afetam a produtividade da cultura da alface, ocasionando níveis de perdas variáveis

de acordo com a severidade de cada patossistema. São descritas mais de 75 doenças bióticas ou abióticas, as quais variam de acordo com o material genético utilizado, geografia, clima e manejo adotados (Still, 2017). Tratando-se de doenças etiologia viral, membros pertencentes aos gêneros *Potyvirus* e *Orthospovirus* são os principais causadores de prejuízos econômicos no Brasil (Pavan et al. 2008). Os membros do gênero *Potyvirus* compreendem vírus de RNA fita simples que são transmitidos via afídeos e sementes, sendo isolados da espécie *Lettuce mosaic virus* o principal representante. Os membros do gênero *Orthospovirus* compreendem vírus de RNA de fita simples, genoma negativo e ambisenso, tri-segmentados, os quais são transmitidos por espécies do inseto praga tripses, sendo conhecidos popularmente pelo nome comum da doença “vira-cabeça”. Esse patossistema representa o principal tema dessa tese e será abordado com maior detalhamento.

### **Gênero *Orthospovirus***

**Importância econômica e histórico da doença vira-cabeça** – Os membros do gênero *Orthospovirus* compõem um dos principais complexos virais que acometem diferentes culturas, sendo particularmente severos nos cultivos de alface, tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), pimentas (*C. chinense* Jacq.; *C. frutescens* L. e *C. baccatum* var. *pendulum* (Willd.) Eshbaugh), batata (*Solanum tuberosum* L.), soja (*Glycine max* L.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.), ocasionando perdas econômicas (Pappu et al., 2009). O Brasil, em conjunto com países da Ásia, integra o grupo dos principais países com incidência das orthospovirose (Martínez et al., 2019). Esse grupo de patógenos foi inicialmente relatado na cultura do tomateiro em 1915 na Austrália (Brittlebank, 1919). No entanto, o agente etiológico permaneceu desconhecido até 1930, sendo identificado como *Orthospovirus tomatomaculae* (TSWV) (Samuel et al., 1930). No Brasil, o primeiro relato da doença (denominada informalmente pelos produtores de ‘vira-cabeça’) ocorreu em plantas de fumo no

ano de 1937 (Silberschmidt, 1937). Na cultura da alface, os primeiros relatos do ‘vira-cabeça’ no Brasil ocorreram ao final da década de 1930 e, posteriormente, nas décadas de 1960-1970 (Costa & Foster, 1938; Chagas, 1970). No entanto, surtos epidêmicos da doença se intensificaram no final da década de 1980, quando plantios de alface em campo aberto atingiram entre a 30–100% de perdas. Em 2004, perdas na ordem de 40% foram relatadas em cultivos hidropônicos, demonstrando a severidade da doença independente do sistema de plantio utilizado (Moraes et al., 1988, Colariccio et al., 2004, Lima et al., 2016). Dentre os orthospovirus relatados na cultura da alface no Brasil estão o TSWV, *Orthospovirus arachinuali* (GRSV) e *Orthospovirus tomatoflavi* (TCSV) (Lima et al. 2016, Kitajima, 2020). Levantamentos realizados indicam isolados da espécie GRSV apresentam predominância na cultura da alface (Lima et al., 2016; Martínez et al., 2019).

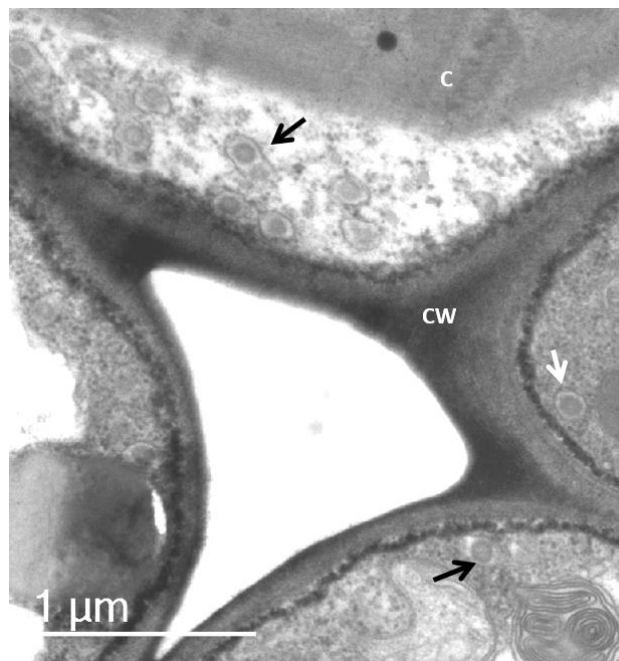
### **Taxonomia**

Os orthospovirus estão classificados no domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Polyploviricotina*, classe *Ellioviricetes* ordem *Bunyavirales*, família *Tospoviridae* e gênero *Orthospovirus* (ICTV, 2022). Os vírus presentes na ordem *Bunyavirales* são caracterizados pela ampla gama de hospedeiros, acometendo plantas e animais como, insetos, mamíferos e aves (Schreur et al., 2018). Atualmente 14 famílias são alocadas nesta ordem, sendo *Arenaviridae*, *Cruliviridae*, *Discoviridae*, *Fimoviridae*, *Hantaviridae*, *Leishbuviridae*, *Mypoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae*, *Tospoviridae*, *Tulasviridae* e *Wupedeviridae*, no entanto, apenas as famílias *Tospoviridae*, *Phenuiviridae* e *Fimoviridae* foram relatadas ocasionando doenças em plantas (Komerlink et al., 2021; ICTV, 2022). A família *Tospoviridae* apresenta apenas o gênero *Orthospovirus*, contendo, até o momento, 26 espécies. Análises filogenéticas baseadas no genoma completo de membros 22 espécies de *Orthospovirus*, indicam a possibilidade de uma

subdivisão do gênero em quatro (ou cinco) novos gêneros baseados em quatro filogrupos (A – *Orthospovirus tomatomaculae*, B – *Orthospovirus glycininecrovenae*, C – *Orthospovirus iridimaculaflavi*, D – *Orthospovirus citrullomaculosi*) (Butković et al., 2021). A partir da adoção da nomenclatura binomial pelo ICTV, os nomes de espécies passaram a ser descritos em latim. Os critérios para demarcação de espécies no gênero são definidos pela especificidade com o vetor, gama de hospedeiros, sorologia da proteína N (nucleoproteína), e identidade de aminoácidos da proteína N menor que 90% em comparação com outras espécies previamente descritas (King et al., 2011).

### Etiologia

Os *Orthospovirus*, gênero denominado da espécie tipo *Orthospovirus tomatomaculae*, são vírus de RNA fita simples com polaridade negativa e ambisenso, tendo seu genoma tri-segmentado, circundado por um envelope glicoproteico de proteínas Gn/Gc com partícula em formato esférico de diâmetro entre 80–120 nm (**Figura 1**).

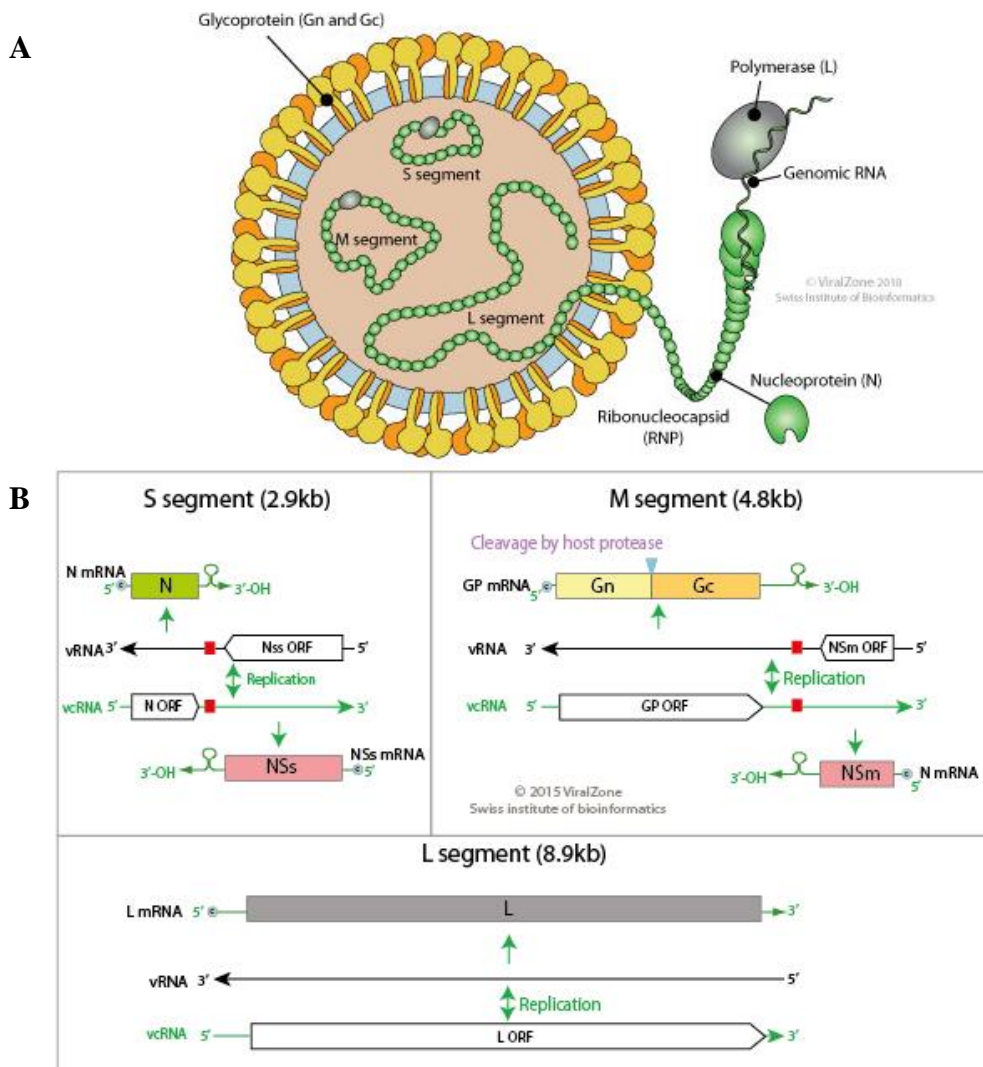


**Figura 1.** Micrografia eletrônica de transmissão de um corte de uma lesão clorótica presente no tecido foliar de *Cichorium intybus* L. (família Asteraceae) infectado pelo GRSV (Jorge et



al., 2022). Partículas típicas de membros do gênero *Orthospovirus* delimitadas por membrana (80–100 nm de diâmetro) estão presentes dentro das cisternas (setas), em um grupo de células parenquimatosas esponjosas. C = cloroplasto; CW = parede celular. Fonte: Elliot W. Kitajima.

Os segmentos são classificados quanto ao seu tamanho em RNA S (small, ~2,9kb), RNA M (medium, ~4,8kb) e RNA L (large, ~8,9kb). O RNA S é ambisenso, precursor da proteína não estrutural supressora de silenciamento gênico (NSs) na orientação senso positivo, enquanto na orientação senso negativo é precursor da proteína do nucleocapsídeo N (regulação dos processos de transcrição e replicação). O RNA M é ambisenso, sendo precursor das glicoproteínas Gn e Gc (na orientação senso negativo) e uma segunda proteína não estrutural (NSm) na orientação senso positivo, responsável pela competência no movimento célula-a-célula. O RNA L é senso negativo, precursor da polimerase dependente do RNA viral (RdRp) (de Avila et al., 1992, Kormelink et al., 2011) (**Figura 2**). Os terminais 3' e 5' são conservados e complementares (5'–AGA GCA AU e 3'–UCU GCU UA) entre os membros da família *Tospoviridae*, facilitando o emparelhamento de bases dos terminais de cada RNA, auxiliando no processo de transcrição e replicação. A divisão de espécies de orthospovirus quanto as origens eram previamente baseadas na análise filogenética de segmentos parciais da proteína N, dando origem a dois geogrupos: Velho Mundo (Ásia) e Novo Mundo (Américas) (Pappu et al., 2009; Gilbertson et al., 2015). No entanto, estudos recentes conduzidos com base em sequencias completas de membros 22 espécies do gênero *Orthospovirus*, denotam que a divisão em geogrupos se mostra incipiente. As espécies foram agrupadas em quatro filogrupos, com potencial concepção de novos gêneros a partir de cada filogrupo, desmembrando o único gênero *Orthospovirus* (Butković et al., 2021).



**Figura 2.** Representação esquemática do vírion de membros do gênero *Orthotospovirus*. **(Painel A):** O vírion é composto por um envelope lipídico, que encapsula os três segmentos genômicos de RNA, denominados de acordo com seu tamanho pequeno (S), médio (M) e grande (L), respectivamente. O RNA viral é encapsidado pela nucleoproteína (N), que interage com as glicoproteínas virais que atravessam a membrana (GN e GC). **(Painel B):** Organização do genoma dos orthotospovirus, indicando os quadros de leitura abertos dos genes virais encontrados em cada RNA genômico. Os RNAs genômicos de orthotospovirus codificam produtos gênicos na orientação de sentido negativo ou ambisense (**Fonte:** ViralZone).

### Sintomatologia

Os sintomas característicos do vira-cabeça da alface envolvem a presença de anéis cloróticos e/ou necróticos, clorose, bronzeamento e deformação foliar da região apical. Quanto mais precoce a infecção da hospedeira, mais graves (**Figura 2**).



**Figura 3.** Plantas de alface apresentando alguns dos sintomas típicos de infecção por membros do gênero *Orthospovirus* (deformação foliar mais intensa na região apical, lesões necróticas circulares coalescidas dando origem a extensas lesões necróticas). **(A)** Sintomas em uma cultivar do morfotipo 'Iceberg' (= 'Americana'); **(B)** Sintomas em uma cultivar do morfotipo 'Crespa' (Fonte: Acervo pessoal).

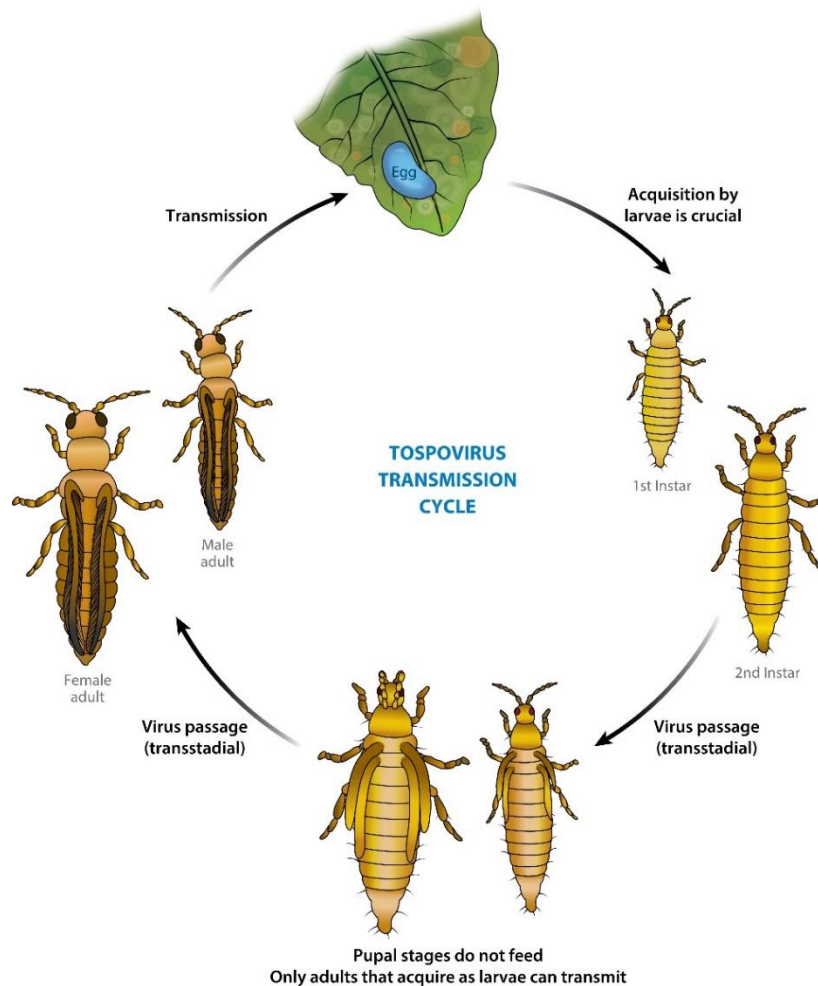
Diversos fatores podem afetar a severidade dos sintomas, sendo os principais a cultivar empregada, condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença (principalmente períodos longos secos e temperaturas elevadas) e o estágio de desenvolvimento da hospedeira

no momento da aquisição (infecção) pelo patógeno (quanto maior a precocidade, maior a gravidade) (Lima et al., 2016).

### **Epidemiologia**

Os orthospovirus apresentam um amplo espectro de espécies hospedeiras, entre plantas de importância econômica e daninhas. Dentre as principais culturas econômicas acometidas, além da cultura da alface estão o tomateiro, pimentão, chicória, almeirão, soja, fumo, pimentas, batata, berinjela, grão de bico, lentilha, ervilha e jiló (Kitajima, 2020; Jorge et al., 2021; Jorge et al., 2022, Jorge et al., 2023). Entre as plantas daninhas, diferentes grupos estão identificados: joá-de-capote (*Nicandra physaloides* (L.) Gaertn), maria-pretinha (*Solanum americanum* Mill.), espécies de *Physalis*, trombeta (*Datura stramonium* L.) caruru (*Amaranthus* spp.), o picão (*Bidens pilosa* L.), a beldroega (*Portulaca oleracea* L.), a serralha (*Sonchus oleraceus* L.), a bela-emília (*Plumbago auriculata* Lam.), a santamaria (*Chenopodium ambrosioides* L.) e a mostarda (*Brassica campestris* L.) (Lima et al., 2016). Kitajima (2020) realizou o levantamento do histórico dos relatos de plantas acometidas por vírus e viroides no Brasil, e criou uma lista detalhada com todas os membros do gênero *Orthospovirus* relatadas na agricultura acometendo plantas de diferentes espécies. Os membros do gênero *Orthospovirus* relatados no Brasil e seus respectivos números de hospedeiras registradas até o momento (Kitajima, 2020) são: *Orthospovirus phaseolinecrotessellati* (uma única espécie hospedeira), *Orthospovirus chrysanthinecrocaulis* (nove hospedeiras), *Orthospovirus arachianuli* (17 hospedeiras), *Orthospovirus iridimaculafavi* (uma espécie hospedeira), *Orthospovirus tomatoflavi* (17 hospedeiras), *Orthospovirus tomatomaculae* (23 hospedeiras), *Orthospovirus cucurbichlorosis* (seis hospedeiras).

Os membros do gênero *Orthospovirus* são transmitidos exclusivamente em condições naturais por insetos denominados tripes (ordem *Thysanoptera*, família *Thripidae*) e, em condições experimentais, pela técnica de inoculação mecânica. Não são conhecidos relatos de passagem transovariana de partículas virais para progênes de insetos virulíferos, bem como a transmissão via sementes (Pappu et al., 2009). O ciclo de vida do vetor é composto por quatro estádios, compreendidos pelo estágio de ovo, larva (Instar I e II, com elevada atividade e responsável pela aquisição do vírus), pupa (pré-pupa e pupa, ambos inativos) e adulto com duração de 30 a 45 dias (**Figura 3**). O estágio adulto é ineficaz na aquisição de virulência, mesmo durante longos períodos de alimentação (Wijkamp et al., 1995). Durante a alimentação, as partículas virais são transportadas até o intestino médio onde ocorre a multiplicação, posteriormente migrando para as glândulas salivares e sendo disseminadas durante a alimentação por parte do adulto virulífero (Nagata et al., 2002). Épocas quentes e secas favorecem a transmissão do vírus pelo aumento na atividade do vetor, o qual possui relação de transmissão do tipo circulativa-propagativa (Wijkamp et al., 1995; Ullman et al., 1997). Entretanto, períodos chuvosos com elevada pluviosidade e frequência, podem retardar o desenvolvimento do tripe (Lima et al., 2016). No Brasil, as principais espécies de tripes relatadas na cultura da alface são *Frankliniella occidentalis* (Pergande), *F. schultzei* (Trybom), *Thrips tabaci* Lindeman e *T. palmi* Karny (Monteiro, 2002; Monteiro & Lima, 2011). O gênero *Frankliniella* apresenta maior importância na cultura da alface devido a maior competência e frequência na transmissão de TSWV, GRSV e TCSV (Nagata et al., 2004; Lima et al., 2016).



**Figura 4.** Esquema representando o ciclo de vida de espécies de *Thysanoptera* (família *Thripidae*). Estes insetos eclodem de ovos e adquirem, partículas de vírus de plantas acometidas. O vírus é então transmitido transstadialmente entre os demais estádios de pupa e adultos. Apenas adultos que ingeriram partículas de vírus em estádios larvais tem competência na transmissão dos membros do gênero *Orthotospovirus*, tendo as partículas virais mantidas na sua glândula salivar. (Fonte: Rotenberg et al., 2015).

A competência na transmissão de orthotospovirus é intimamente relacionada a espécie do vetor, planta hospedeira e espécie viral (Dhall et al., 2021). A interação entre *F. occidentalis* e TSWV é bem discutida, demonstrando que a ampla dispersão da espécie do vetor apresenta papel crucial na transmissão de TSWV, o que elucidada a rápida dispersão de TSWV para diferentes regiões do mundo (Nagata et al., 2002; Gilbertson et al., 2015; Oliver & Whitfield 2016). No entanto, este cenário de predominância de TSWV na cultura da alface tem sido modificado. Levantamentos recentes e coletas de plantas de alface sintomáticas têm indicado GRSV como sendo a espécie predominante. Este aumento pode estar relacionado a predominância do vetor

*F. schultzei* em cultivos de alface, que provavelmente (ainda não confirmado) possui maior competência na transmissão de GRSV quando comparado as demais espécies (Nagata et al., 2004, Lima et al., 2016).

### **Processo de infecção dos orthotospovirus**

Após sua entrada na hospedeira, ocorre a desagregação do complexo de ribonucleoproteínas, e o genoma viral é replicado no citoplasma pela atividade da RdRp do segmento L. A expressão de todos os genes ocorre pela síntese de mRNA subgenômicos, sendo iniciado por um processo conhecido por ‘*cap-snatching*’, sendo um processo de iniciação da transcrição no qual uma sequência de nucleotídeos (10 a 20 nucleotídeos) é clivada da extremidade 5' dos mRNAs do hospedeiro por uma atividade endoglucanase da RdRp viral facilitando o processo de produção de proteínas virais (Kormelink et al., 2011). No processo de formação do vírion, estes patógenos virais apresentam afinidade por organelas membranosas, principalmente o complexo de Golgi e retículo endoplasmático, onde as glicoproteínas e, provavelmente, o envelope lipídico são recrutados (Kitajima, 1965, Kitajima et al., 1992; Kikkert et al., 1999; Ribeiro et al., 2009). A proteína NSs (supressora de silenciamento) interfere no processo infeccioso, se ligando com RNAs de dupla fita longos, que impede a clivagem pela enzima ‘*dicer*’. Outro detalhe refere-se à inativação do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) pelo sequestro de siRNAs e ligação a pequenos RNAs. Outra função da NSs refere-se à função enzimática do tipo NTPase/dATPase e 5'-fosfatase da proteína, onde o complexo RISC não consegue reconhecer ou carrear os fragmentos de RNA que tenham as extremidades fosforiladas (Takeda et al., 2002, Lokesh et al., 2010, Schenntler et al., 2010). A proteína NSm (movimento) interage por intermédio de plasmodesmas com a membrana do retículo endoplasmático, para que ocorra a interação com a proteína N, assim direcionando as



ribonucleoproteínas para o plasmodesma viabilizando o transporte célula-a-célula (Leastro et al., 2015, Feng et al., 2016).

### **Estratégias de controle do ‘vira-cabeça’ no cultivo da alface.**

Como uma característica comum de todos os patossistemas de origem viral, o manejo de orthotospoviroses na cultura da alface é baseado em medidas preventivas, controle do vetor, e resistência genética (quando disponível). As medidas preventivas são baseadas na implementação de condições de produção de mudas ou de cultivo que impeçam ou minimizem o acesso às plantas de insetos vetores virulíferos. Isso pode ser realizado por intermédio de telados ou casas de vegetação, com telas com malhas de dimensões adequadas para a impedir o trânsito dos insetos vetores. Outra ação envolve a remoção de plantas daninhas que sejam reconhecidamente hospedeiras alternativas do vírus e do inseto vetor. O controle químico do vetor é o método mais utilizado em cultivos a campo, no entanto, apenas duas espécies de tripses estão contempladas com produtos registrados para a cultura da alface, sendo *F. schultzei* e *Thrips tabaci*, com apenas três ingredientes ativos (imidacloprido, Sephora flavescens e cloridato de formetanato). Além disso, a elevada eficiência de transmissão viral pelos insetos vetores faz com que o controle químico se torne muito pouco eficiente para controlar os danos induzidos pelo ‘vira-cabeça’ (Lima et al. 2016).

### **Mecanismos de resistência contra a infecção viral**

Durante o processo de coevolução entre plantas e vírus, as plantas desenvolverem diferentes mecanismos de resistência contra os vírus e seus vetores. Os mecanismos podem ser divididos dentre uma resposta passiva de resistência, baseado em respostas anatômicas e/ou componentes bioquímicos, bem como em respostas ativas de resistências baseados no reconhecimento de proteínas estruturais e/ou efetoras (Calil & Fontes, 2017; Liu et al. 2017). O reconhecimento de componentes virais se dá por duas camadas de defesa, denominadas de PTI (PAMP-Triggered



Immunity) e ETI (Effector-triggered immunity). PTI é a primeira resposta da reação de imunidade mediada pelas plantas após o reconhecimento de moléculas conservadas denominadas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP). Os PAMP são detectados por proteínas reconhecedoras de padrões (Pattern recognition receptors ou PRR), desencadeando uma série de respostas como a deposição de calose, fluxo de íons, acumulação e espécies reativas de oxigênio (ROS). Outra resposta observada é mediada pela proteína NIK1 (nuclear Shuttle protein (NSP)- interacting kinase 1), que é uma proteína da família das receptoras do tipo quinase (RLK), que atua em respostas de defesa a infecção por membros do gênero *Begomovirus* através do reconhecimento da proteína NSP (Zorzatto et al. 2015). Apesar de diversos indicativos sobre a presença de PTI na resposta a infecção por vírus, nenhum mecanismo foi completamente caracterizado, somando-se a isso, a dificuldade em se estabelecer o conceito de PAMP oriundos de agentes de etiologia viral, que apresentam a característica de alta variabilidade via mutações durante a replicação (Nicaise, 2014; Calil & Fontes, 2017).

A segunda resposta de imunidade de plantas é mediada pela ETI. A ETI é baseada no reconhecimento de proteínas efetoras de patógenos adaptados (denominadas de genes de avirulência) pela planta hospedeira através de imunoreceptores intracelulares, denominados de proteínas R, correspondendo a uma resposta do tipo gene-a-gene (Jones & Dangl, 2006). As respostas associadas a ROS, influxo iônico de cálcio, MAP quinases (MAPK), genes relacionados a defesa, ativação de vias hormonais e reprogramação da maquinaria transcricional (Calil & Fontes, 2017). Os hormônios são atuantes essenciais nas interações entre vírus e plantas, modulando o movimento, replicação e infecção sistêmica de vírus de plantas. O ácido abscísico, ácido salicílico, jasmônico ácido, etileno, ácido giberélico, citocinina e brassinosteróides são exemplos de fitohormônios associados à resposta das plantas a patógenos (Zhao & Li, 2021). Outra resposta associada são vias de degradação proteicas,

como o sistema Ubiquitina-proteasoma que é responsável pela degradação de proteínas intracelulares, atuando também como um mecanismo de para eliminação de proteínas virais. Esse sistema é modulado em diferentes níveis durante a infecção viral (Alcaide-Loridan & Jupin, 2012).

### **Histórico e panorama atual do melhoramento genético da alface visando a resistência a orthospovirus.**

Esforços para obtenção de plantas de alface resistentes a orthospovirose foram realizados via obtenção de progênies do cruzamento entre ‘PI 342517’ e ‘PI 342444’. Progênies obtidas apresentaram herança do tipo parcialmente dominante, similares aos dois parentais (O’Malley & Hartmann, 1989). O cruzamento interespecífico entre uma espécie silvestre *L. saligna* e *L. sativa* gerou progênies parcialmente resistentes (Cho et al., 1996). No Brasil, em 1987 o Instituto Agrônomo de Campinas liderou o primeiro programa de melhoramento de alface visando a resistência a orthospovirus (Nagai, 1989). O objetivo inicial foi introduzir resistência no grupo varietal ‘Manteiga’ (que é muito suscetível) através do desenvolvimento de progênies derivadas do cruzamento entre a variedade ‘Regina’ x ‘PI 342517’, de nome série Brasil 600 resistentes a TSWV (Nagai, 1989). Foram selecionadas progênies F2, e incorporadas ao programa de melhoramento. Após o avanço de população, na geração F5 foram iniciados os testes para aptidão destas linhagens para o cultivo a campo e hidropônico. Linhagens F5 foram submetidas a avaliação a campo, sendo a introdução ‘PI 342444’ identificada como um material promissor para as condições brasileiras, apresentando níveis de infecção bem inferiores aos observados na testemunha-padrão (Guimarães et al., 2009). Mais recentemente, ensaios conduzidos por Fontes et al. (2019) indicaram que a resistência conferida pelo acesso ‘PI 342444’ é do tipo espécie viral-específica, funcionando apenas contra isolados de TSWV e se mostrando não efetiva contra isolados de GRSV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCAIDE-LORIDAN, C; JUPIN, I. 2012. Ubiquitin and plant viruses, let's play together!. **Plant Physiology**, 160: 72–82.

BRITTLEBANK, CC. 1919. Tomato diseases. **Journal of the Department of Agriculture in Victoria**, 17: 1348–1352.

BUTKOVIĆ, A; GONZÁLEZ, R; ELENA, SF. 2021. Revisiting *Orthospovirus* phylogeny using full-genome data and testing the contribution of selection, recombination and segment reassortment in the origin of members of new species. **Archives of Virology**, 166(2): 491–499.

CALIL, IP; FONTES, EP. (2017). Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. **Annals of Botany**, 119(5): 711–723.

CHAGAS, CM. Vira-cabeça em alface. 1970. **O Biológico**, 36(9): 256–257.

CHO, J.; CUSTER, DM; BROMMONSCHENKEL, SH; TANKSLEY, SD. 1996. Conventional breeding: Host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to Tomato spotted wilt virus in vegetables. **Acta Horticulturae**, 431: 367–378.

COLARICCIO, A; EIRAS, M; CHAVES, ALR; HARAKAWA, R; CHAGAS, CM. 2004. Tomato chlorotic spot virus (TCSV) in hydroponic-grown lettuce in São Paulo state, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 29(3): 307–311

COSTA, AS; FORSTER RA. 1938. Transmissão mecânica de vira-cabeça por fricção com suco. **Revista de Agricultura**, 13: 249–262.

COSTA, CP; SALA, FCA. 2005. A evolução da alfaceicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, 23(1): 158–159.

DAVIS, RM; SUBBARAO, KV; RAID, RN; RAID, EA. 1997. **Compendium of Lettuce Diseases**. 1ª ed. APS Press. St. Paul, MN.

DE ÁVILA, A; DE HAAN, P; KITAJIMA, EW; KORMELINK R; RESENDE RO; GOLDBACH R; PETERS D. 1992. Characterization of a distinct isolate of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. **Journal of Phytopathology**, 134: 133–151.

DE VRIES, IM. 1997. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 44: 165–174.

DHALL, H; JANGRA, S; BASAVARAJ, YB; GHOSH, A. 2021. Host plant influences life cycle, reproduction, feeding, and vector competence of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae), a vector of tospoviruses. **Phytoparasitica**, 49: 501–512.

ECHER, R; LOVATTO, PB; TRECHA, CO; SCHIEDECK, G. 2016. Alface à mesa: Implicações sócio-econômicas e ambientais da semente ao prato. **Revista Thema** 13 (3): 17–29.

FAO, 2019. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat>. Acesso em 02 abril 2021.

FENG Z; XUE F; XU M; CHEN X; ZHAO W; GARCIA-MURRIA MJ; MINGARRO I; LIU Y; HUANG Y; JIANG L; ZHU M; TAO X. 2016. The ER-Membrane transport system is critical for intercellular trafficking of the NSm movement protein and Tomato spotted wilt tospovirus. **PloS Pathogens** 12: e1005443.

FILGUEIRA, F.A.R. 2008. **Novo manual de Olericultura**. 3ªEd. Viçosa, MG: Editora UFV. 421p.

FONTES, MG; CABRAL, CS; LIMA, MF; FONSECA, MEN; BOITEUX, LS. 2019. Phenotypic expression and species-specific reaction of *Lactuca sativa* ‘PI 342444’ to groundnut ringspot virus (GRSV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates. **European Journal of Plant Pathology**, 155(1): 231–238.

FUNK, VA; SUSANNA, A; STUSSEY, TF; ROBINSON, H. 2009. Classification of Compositae. In: Funk, V.A., Susanna. A., Stuessy. T.F., Bayer, R.J. (eds). **Systematics**,

**evolution, and biogeography of Compositae.** International Association for Plant Taxonomy. Vienna, Austria, 171–189.

GILBERTSON RL; BATUMAN O; WEBSTER CG; ADKINS S. 2015. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review of Virology**, 2: 67–93.

GUIMARÃES, AM; PAVAN, MA; SILVA, N. 2009. Comportamento de progênies F5 de alface às tospoviroses em condições de campo. **Unimar Ciências**, 18: 37–40.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático de Produção Agrícola - LSPA, 2019. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Agricola/Levantamento\_Sistemático\_da\_Producao\_Agricola\_[mensal]/Fasciculo/lspa\_201612.pdf > Acesso em: 02abril2021. <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuário/censo-agropecuário2017#horticultura>

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES EXECUTIVE COMMITTEE. 2020. The new scope of virus taxonomy: Partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. **Nature Microbiology**, 5(5): 668.

JONES, JD; DANGL, JL. 2006. The plant immune system. **Nature**, 444(7117), 323-329.

JORGE, TS; FONTES, MG; LIMA, MF; BOITEUX, LS; FONSECA, MEN; KITAJIMA, EW. 2022. Natural Infection of *Cichorium intybus* (Asteraceae) by groundnut ringspot virus (Genus *Orthospovirus*) isolates in Brazil. **Plant Disease**, 106: 2005.

KING, AM; LEFKOWITZ, E; ADAMS, MJ; CARSTENS, EB. 2011. **Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** 9: 1326p.

KITAJIMA, EW; DE ÁVILA, AC; RESENDE, RO; GOLDBACH, RW; PETERS, D. 1992. Comparative cytological and immunological labeling studies on different isolates of tomato spotted wilt virus. **Journal of Submicroscopy Cytological Pathology**, 24: 1–14

KITAJIMA, EW. 1965. Electron microscopy of Vira-Cabeça virus (Brazilian Tomato Spotted Wilt Virus) within the host cell. **Virology**, 26: 89–99.

KORMELINK, R; GARCIA, ML; GOODIN, M; SASAYA, T; HAENNI, AL. 2011. Negative-strand RNA viruses: The plant-infecting counterparts. **Virus Research**, 162: 184–202.

LEASTRO, MO; PALLAS, V; RESENDE, RO; SANCHEZ-NAVARRO, JA. 2015. The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. **Virology**, 478: 39–49.

LIU, S. R; ZHOU, JJ; HU, CG; WEI, CL; ZHANG, JZ. 2017. MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. **Frontiers in Microbiology**, 8: 1801.

LIMA, M; MICHEREFF FILHO, M; BOITEUX, L; SUINAGA, F. 2016. Doença vira-cabeça em alface: Sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica Número 153**. Brasília-DF, 16p.

LOKESH, B; RASHMI, PR; AMRUTA, BS; SRISATHIYANARAYANAN, D; MURTHY, MRN; SAVITHRI, HS. 2010. NSs encoded by Groundnut bud necrosis virus is a bifunctional enzyme. **PLoS One**, 5(3): e9757.

MARTÍNEZ, RT; DE ALMEIDA, MM; RODRIGUEZ, R; CAYETANO, X; DE OLIVEIRA, AS; SILVA, JM; RESENDE, RO. 2019. Analyses of orthotospovirus populations and dispersion under different environmental conditions in Brazil and in the Dominican Republic. **Tropical Plant Pathology**, 44(6): 511–518.

MONTEIRO, RC. 2002. The Thysanoptera fauna of Brazil. In: MARULLO, R.; MOUND, L. (Ed.). **Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Thysanoptera**. Canberra: Australian National Insect Collection, 325–340.

MONTEIRO, RC; LIMA, EFB. 2011. Thysanoptera of Brazil. Disponível em: Acesso em: 02 de abr. de 2021. MONTEIRO, R. C; MOUND, L. A. 2012. **Thysanoptera**. In: RAFAEL, JA;

MELO, GAR; CARVALHO, CJB; CASARI, SA; CONSTANTINO, R. (Ed.). Insetos do Brasil: Diversidade e taxonomia. Ribeirão Preto: Holos, p.407–422.

MORAES, GJ; WANDERLEY, LJ; COSTA, AS. 1988 Surto de vira-cabeça na cultura da alface em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, 6(2): 24–25.

NAGAI, H. 1989. PI 342517, uma introdução de alface com resistência ao vírus de vira cabeça. **Horticultura Brasileira**, 7: 66

NAGATA, T; INOUE-NAGATA, AK; VAN LENT, J; GOLDBACH, R; PETERS, D. 2002. Factors determining vector competence and specificity for transmission of Tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, 83(3): 663–671.

NAGATA, T; ALMEIDA, ACL; RESENDE, RDO; DE ÁVILA, AC. 2004. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, 53(2):136–140.

O'MALLEY, PJ; HARTMANN, RW. 1989 Resistance to tomato spotted wilt virus in lettuce. **HortScience**, 24: 360–362.

PAPPU, HR; JONES, RAC; JAIN, RK. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**, 141: 219–236

PAVAN, MA; KRAUSE-SAKATE, R; SILVA, ND; ZERBINI, FM; LE GALL, O. 2008. Virus diseases of lettuce in Brazil. **Plant Viruses**, 2(1): 35–41.

RIBEIRO, D; GOLDBACH, R; KORMELINK, R. 2009. Requirements for ER-Arrest and sequential exit to the Golgi of Tomato spotted wilt virus glycoproteins. **Traffic**, 10: 664–672.

RILEY, DG; ANGELELLA, GM; MCPHERSON, RM. 2011. Pine pollen dehiscence relative to thrips population dynamics. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 138(3): 223–233.

RYDER, E.J., 1986. Lettuce breeding. In: M.J. BASSET (ed.). **Breeding Vegetable Crops**, The AVI Publishing Company, Inc., Westport. 433–474.

- RYDER, E.J. 1999. **Lettuce, Endive and Chicory**. CABI Publishing, USA. 208 p.
- SALA, FC; COSTA, CP. 2012. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, 30:187–194.
- SAMUEL, G; BALD, JG; PITMAN, HA. 1930. Investigations on ‘spotted wilt’ of tomatoes. **Commonw. Aust. Counc. Sci. Ind. Res. Bull.** 44: 64.
- SCHNETTLER, E; HEMMES, H; HUISMANN, R; GOLDBACH, R; PRINS, M; KORMELINK R. 2010. Diverging affinity of Tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. **Journal of Virology**, 84: 11542–11554.
- SCHREUR, PJW; KORMELINK, R; KORTEKAAS, J. 2018. Genome packaging of the *Bunyavirales*. **Current Opinion in Virology**, 33:151–155.
- SILBERSCHMIDT, KM. 1937. A doença de vira-cabeça do fumo. **O Biológico**, 3: 183–184.
- STILL, DW. 2017. Lettuce Diseases and Disorders. In: SUBBARAO, KV.; DAVIS, RM.; GILBERTSON, RL.; RAID, RN. (eds.). **Compendium of Lettuce Diseases and Pests**, 2<sup>a</sup> ed. St. Paul, MN.
- TAKEDA A; SUGIYAMA K; NAGANO H; MORI M; KAIDO M; MISE K; TSUDA S; OKUNO T. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. **FEBS Letters**, 532: 75–79.
- ULLMAN, DE, SHERWOOD, JL, GERMAN, TL. 1997. Thrips as vectors of plant pathogens. Pages 539–556, In: LEWIS, T (ed) **Thrips as Crop Pests**, CAB International, Wallingford, UK.
- WIJKAMP, I; ALMARZA, N; GOLDBACH, R; PETERS, D. 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, 85: 1069–1074.



ZORZATTO, C; MACHADO, JPB; LOPES, KV; NASCIMENTO, KJ; PEREIRA, WA; BRUSTOLINI, OJ; FONTES, EP. 2015. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. **Nature**, 520(7549): 679–682.

ZHAO, S; LI, Y. 2021. Current understanding of the interplays between host hormones and plant viral infections. **PLoS Pathogens**, 17(2): e1009242.

## **CAPÍTULO 2**

### **CLASSICAL AND BIOTECHNOLOGICAL BREEDING OF TOMATO, *Capsicum*, AND LETTUCE FOR RESISTANCE TO ORTHOTOSPOVIRUSES IN BRAZIL**

**(Publicado como um capítulo do livro:** Classical and biotechnological breeding of tomato, *Capsicum*, and lettuce for resistance to orthospoviruses in Brazil. In: Silva HR; Almeida LC, Rios JA, Michereff SJ. (Org.).

Manejo de doenças de plantas: Controle genético, químico e biológico, nas perspectivas acadêmica e empresarial. 1ed. Recife-PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco, v. 1, p. 7–26, 2023)

## **Classical and biotechnological breeding of tomato, *Capsicum*, and lettuce for resistance to orthospoviruses in Brazil**

**Tiago Silva Jorge**, Doutorando

Universidade de Brasília (UnB) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Instituto de Biologia – IB, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [tiagosiljorge@outlook.com](mailto:tiagosiljorge@outlook.com)

**Lídia Nascimento Queiroz**, Dra.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [lidianqz@gmail.com](mailto:lidianqz@gmail.com)

**Mirtes Freitas Lima**, Pesquisadora Dra.

Embrapa Hortaliças (CNPB) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [mirtes.lima@embrapa.br](mailto:mirtes.lima@embrapa.br)

**Maria Esther de Noronha Fonseca**, Pesquisadora Dra.

Embrapa Hortaliças (CNPB) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [maria.boiteux@embrapa.br](mailto:maria.boiteux@embrapa.br)

**Maria Geane Fontes**, Dra.

Universidade de Brasília (UnB) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [geane\\_fontes@yahoo.com](mailto:geane_fontes@yahoo.com)

**Rita de Cássia Pereira-Carvalho**, Professora Dra.

Universidade de Brasília (UnB) – Departamento de Fitopatologia, Instituto de Biologia – IB, Brasília–DF, Brazil.

Email: [rcpcarvalho@unb.br](mailto:rcpcarvalho@unb.br)

**Elliot Watanabe Kitajima**, Professor Dr.

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP) – Fitopatologia e Nematologia, Piracicaba–SP, Brazil.

E-mail: [ewkitaji@usp.br](mailto:ewkitaji@usp.br)

**Francisco José Lima Aragão**, Pesquisador Dr.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [francisco.aragao@embrapa.br](mailto:francisco.aragao@embrapa.br)

**Leonardo Silva Boiteux**, Pesquisador Dr.

Embrapa Hortaliças (CNPB) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [leonardo.boiteux@embrapa.br](mailto:leonardo.boiteux@embrapa.br)

## ABSTRACT

Orthotospoviruses (genus *Orthotospovirus*) are yield-limiting pathogens of many vegetable crops, especially tomato (*Solanum lycopersicum* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), and peppers (*Capsicum* species). Tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV) and groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) are the main orthotospoviruses reported infecting these vegetable crops in tropical and subtropical areas across South America. Cultural management strategies for these pathogens are limited, costly, and usually ineffective. Genetic resistance, when available, is by far the most sustainable and practical strategy for their control. Here, we present an overview of the advances in classical and molecular breeding for resistance to orthotospoviruses in lettuce, tomato, and *Capsicum* in Brazil. Although progress has been made towards orthotospovirus resistance, one of the major challenges for the Brazilian breeding programs is yet incorporating multiple and/or broad-spectrum resistance factors into elite lines. In tomatoes, the dominant *Sw-5b* gene (introgressed from the wild relative *S. peruvianum*) is the major commercial breeding source due to its effectiveness to TSWV, GRSV, and tomato chlorotic spot orthotospovirus (TCSV) isolates. In *Capsicum*, inheritance studies with *C. chinense* accessions indicated a major dominant gene (named *Tsw*) controlling a TSWV-specific resistance via a conspicuous HR, which was not effective against GRSV and TCSV isolates. Thus far, no natural sources of resistance to GRSV and TCSV have been detected in *Capsicum* germplasm. The development of dense genetic maps and the availability of complete genome sequences of tomato and *Capsicum* allowed the cloning of the *Sw-5b* and *Tsw* genes. Functional, locus-specific, and co-dominant molecular markers were developed for the *Sw-5b* locus, facilitating its incorporation in commercial cultivars. Transcriptomic analyses of near-isogenic tomato lines (with and without the *Sw-5b* gene) indicated a complex modulation of the gene expression during tomato-GRSV interaction. In lettuce, the accession 'PI 342444' displayed no symptoms and negative serological reactions after inoculation with TSWV isolates. However, severe symptoms were observed after inoculation with GRSV isolates, indicating also a TSWV-specific resistance. The lack of useful natural sources of resistance to GRSV in *Capsicum* and lettuce germplasm is demanding the employment of alternative biotech-based breeding approaches. Transgenic lettuce lines with potential GRSV resistance (obtained via RNA interference strategy) are now under evaluation, paving the way towards the biotech breeding development of novel orthotospovirus resistant cultivars.

**Keywords:** Genetic resistance, *Lactuca sativa* L., *Solanum lycopersicum* L., *Capsicum* species.

## INTRODUCTION

As molecular parasites, curative methods are not effective for the control of plant viruses such as the orthotospoviruses. In addition, there is an overall lack of efficiency in cultural methods as well as chemical control strategies of the orthotospovirus vectors. These unique biological properties of these plant viruses demand the implementation of preventive strategies to avoid pathogen establishment as well as to minimize disease onset and development. In this scenario, genetic resistance to orthotospoviruses and/or their vectors emerges as the most practical, efficient, and sustainable method of control. A list of terms employed in the study of plant-virus interactions and plant resistance to viruses is presented in blue **Box 1**.

### **Box 1. Concepts and terminology associated with plant-virus interactions and plant resistance to viruses**

(Cooper & Jones, 1983; Fraser, 1992; Gómez et al., 2009; Choi & Klessig, 2016; Peng et al., 2018).

**Avirulent/avirulence:** Viral isolates, strains, or species that are unable to cause disease in a given accession of the host plant carrying a specific resistance gene due to the presence of an **avirulence** (*Avr*) factor. Avirulence is a property of a genetic variant of the pathogen.

**Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs):** Host cell-derived molecules resulting from mechanical disruption or degradation due to the attempt of invasion of a potential pathogen. These molecules can be perceived by plant proteins named as PRRs (Pattern Recognition Receptors) and activate defense responses.

**Effectors:** Pathogen molecules that alter host cell structure and function, enabling colonization, infection, and systemic invasion via suppression of host immunity component(s).

**Effector-Triggered Immunity (ETI):** The defense response is based on the recognition of the pathogen effectors, frequently culminating in a hypersensitivity response (**HR**).

**Gene introgression:** Transfer of genetic factors via either regular hybridization or via cell biology techniques across close taxonomically related host species/genera.

**Gene silencing:** Systems of host plant defense against viruses, which involves the silencing of viral genes that are crucial to the infection process. These mechanisms have been used in biotech strategies aiming to develop transgenic plants with virus resistance.

**Hypersensitive Responses (HR):** Histological and biochemical modifications of a given plant tissue, resulting in localization and/or spatial restriction of the challenging pathogen. HR is a type of programmed cell death. Phenotypic expression of HR is usually characterized by local lesions and it is dependent upon multiple factors (e.g., cultivar, viral isolate, and environmental conditions).

**Immunity:** An absolute state of suppression of the viral infection. The virus cannot be detected in the plant cells after successive inoculations and/or exposure to viruliferous vectors. Viral replication and/or translocation are not detected.

**Isolate:** A sample of the viral population taken and purified from either the host plant or directly from the vector using biological and/or molecular strategies for pathogen characterization and purification.

**PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern):** Conserved molecular patterns representing structural components of different etiological agents (bacteria, fungi, viruses, and nematodes) which may be identified as elicitors by the defense system of a given plant species.

**PAMP-Triggered Immunity (PTI):** System that plays a pivotal role as the first layer of basal defense by preventing the colonization/invasion of a potential plant host by yet non-adapted pathogens.

**Pathotype:** A subdivision of viral variants in terms of their ability to infect a given group of hosts (botanic varieties or related species), including host cultivars (= differential cultivars) with well-characterized resistance factors/genes.

**Pattern-recognition receptors (PRRs):** Cellular components able to detect potential invasion and injuries induced by pathogens. Plant PRRs are either surface-localized receptor kinases (RKs) or receptor-like proteins (RLPs) containing various ligand-binding ectodomains that perceive PAMPs and DAMPs.

**Resistance:** The ability of accessions of a given host plant species to suppress, reduce, or delay the injuries and damages caused by viruses. There are degrees and/or levels of resistance, with immunity representing the strongest phenotypic expression of this trait.

**Resistance breakdown:** Occurs when a variant of a virus can to attack/infect either a cultivar considered resistant or a host plant accession that carries a well-characterized resistance genes/locus.

**Tolerance:** The plant is locally or systematically infected (with viral replication and/or systemic movement), but the expression of symptoms is either absent or mild.

**Viral suppressors of gene silencing:** Some viruses can disable the defense systems and/or induce defense-related gene silencing in their hosts, leading to the inactivation of resistance

mechanisms and/or facilitating the process of infection. These virus counter-defense mechanisms include the presence of RNA silencing suppressors and the adoption of silencing-tolerant RNA conformations.

**Virulent/virulence:** Ability of a pathogen to cause disease in a group of accessions of a plant recognized as a host. **Virulence** is a property of isolates/variants of a pathogen.

**Virus strain:** A variant that shares biological, serological, or molecular characteristics with a type species. It can also be defined by its virulence profile concerning to different host resistance genes (differential cultivars) as well as by its genomic variability.

**Natural plant defense mechanisms against viruses** – During co-evolution, plants have developed multiple defense mechanisms against viruses and their vectors, involving passive resistance (due to anatomical and/or biochemical components) as well as active resistance based upon recognition of structural and/or effector proteins of the pathogens/pests, triggering the production of reactive oxygen species (ROs), hormone-mediated resistance pathways, synthesis of secondary compounds, immune receptor signaling, and protein degradation pathways, among others (Calil & Fontes, 2016; Liu et al., 2017). The system for virus recognition can activate two layers of host plant defense, PTI (PAMP-triggered immunity) and ETI (effector-triggered immunity). PAMP (or MAMP) is first layer of plant resistance against viruses, being able to recognize conserved molecules of the invading pathogen (Zipfel, 2008; **Box 1**). Similarly, endogenous injuries associated with virus infection can also elicit defense responses via DAMPs (Hou et al., 2019; **Box 1**). PAMPs comprise extremely conserved molecules that frequently play key roles in pathogen survival and infection ability (Boller & Felix, 2009). PAMPs were expanded to also include virus-derived nucleic acids that may also activate recognition receptors. After the recognition of these molecules by the plant cell surface PRR receptors (**Box 1**), the PTI response is initiated, generating a broad-spectrum defense response (**Box 1**). The PRR receptors involved in the PAMP recognition are subdivided into two main groups: kinase-type receptors and protein-like receptors (Dodds & Rathjen, 2010; **Box 1**). Virus-derived nucleic acid PAMPs may also elicit the Nuclear Shuttle Protein-Interacting

Kinase 1 (NIK1)-mediated antiviral signaling pathway, suppressing global host translation (Teixeira et al., 2019). Beside this, during PTI, the production of a series of defense compounds can occur, which in synchronic combination with the expression of a wide array of other resistance-related genes contribute to very effective defense responses. However, throughout the co-evolutionary process, pathogens have developed an arsenal of strategies to circumvent and/or suppress PTI, including the synthesis of effector proteins (**Box 1**) that can alter the physiological state of the host plant in their favor. On the other hand, natural genetic mutations in the host plants have generated a specific set of effector recognition systems, activating ETI, which is the second layer of plant defense (**Box 1**). ETI is based upon specific cellular recognition of effector proteins of host-adapted pathogens. An effector-coding gene (or its corresponding gene product) when detected by the host ETI is named as *Avr* gene corresponding to the ones described in gene-for-gene systems (Jones & Dangl, 2006). Hormones are pivotal players in plant-virus interactions modulating viral movement, replication, and systemic infection. Abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, ethylene, gibberellic acid, cytokinin, and brassinosteroids are examples of phytohormones associated with plant response to pathogens (Zhao & Li, 2021). **RNA interference (RNAi)** – Plants also developed a recognition system of the nucleic acids of their pathogens. During infection by both RNA and DNA viruses, Dicer-like proteins detect double-stranded RNAs, cleaving them into fragments of 21-24 nucleotides. These fragments named microRNAs (miRNA) or small interfering RNAs (siRNA) are carried to argonaute proteins, forming the RNA-induced silencing complex (RISC) or RNA-induced transcriptional silencing complex (RITS). The RISC complex recognizes and cleaves the target sequence and triggers the post-transcriptional gene silencing process, while the RITS complex either compresses (via histones) or methylates DNA, triggering transcriptional gene silencing (Calil & Fontes, 2016). Counteracting this resistance, plant viruses may encode viral suppressors of RNAi (VSRs) that can disturb the plant RNA silencing pathway, overcoming



this host defense. Some of these silencing suppressors have been extensively studied in different viral species (e.g., NSs protein in *Orthotospovirus*; see sections below).

**Loss-of-susceptibility mutations** – As molecular parasites, all viruses require host factors for their infection (= “host susceptibility factors”). Natural mutations in this subset of pivotal genes for virus infection may also confer resistance to a wide range of viruses and their pathotypes. Such natural sources of resistance are very interesting from the breeding standpoint since they are often monogenic recessive and, in general, stable and durable (Pavan et al., 2010).

**Marker-assisted selection (MAS), isolation, and structural features of virus resistance genes in plants** – Several virus resistance genes were isolated using high-resolution genetic/physical mapping strategies (= map-based cloning or positional cloning). Indeed, a growing collection of genes (dominant and recessive) controlling resistance to diseases of viral etiology are now cloned, and this information can be used in the development of locus-specific or gene-specific (= functional) markers (Dianese et al., 2010). A subset of cloned virus resistance genes is structurally characterized as typical dominant R-genes (de Ronde et al., 2014). The largest class of dominant virus genes encodes proteins with nucleotide-binding (NB) and leucine-rich repeat (LRR) domains, which recognize avirulence factors encoded in the viral genome (de Ronde et al., 2014). The C-terminal regions of the LRR domains drive recognition and specificity. The NB domain may be the molecular switch regulating the signal transduction activation leading to the resistant phenotype (Oliveira et al., 2018). The second type of virus resistance gene involves recessive (loss-of-function) genes (Pavan et al., 2010). Thus far, the majority of them corresponds to loss-of-susceptibility mutations in genes encoding eukaryotic translation initiation factors and molecular markers can be designed for their precise detection (Garcia-Ruiz, 2018).

**The genus *Orthospovirus*** – This group of thrips-transmitted pathogens is one of the most economically and biologically important plant-infecting viral genera, causing substantial losses on crop production worldwide (Pappu et al., 2009). *Tomato spotted wilt orthospovirus* was included in a select group of the ten most relevant plant viruses worldwide from both scientific and economic perspectives (Rybicki, 2015). Until the early 1990s, the genus *Orthospovirus* (former *Tospovirus*) was considered monotypic, having *Tomato spotted wilt orthospovirus* as the type species. Since then, molecular and biological characterization of a wide range of isolates revealed novel species within the genus. Orthospoviruses were initially classified within the former family *Bunyaviridae* (together with animal-infecting viruses) due to their similar virion shape, genomic organization, and phylogenetic relationships. Currently this genus belongs to the order *Bunyavirales*, composed of members with segmented, single-stranded, negative-sense or ambisense RNA genomes (Adams et al., 2017). The orthospoviruses have enveloped and spherical particles (**Figure 1**) with tri-segmented genomes. These genomic segments are classified according to their size as small (S) ( $\approx 2.9\text{kb}$ ), medium (M) ( $\approx 4.8\text{kb}$ ), and large (L) ( $\approx 9\text{kb}$ ) segments. The ambisense S RNA encompasses the coding region of the nucleocapsid protein (N) in the viral complementary sense and a non-structural silencing suppressor protein (NSs) in the viral sense. The ambisense M segment encompasses the coding regions corresponding to the non-structural movement protein (NSm), in the negative sense, and the glycoproteins (Gn/Gc), in the positive sense. The L segment encodes an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) with negative polarity (Kormelink et al., 2021).

**Taxonomic criteria and diversity of the orthospoviruses** – The demarcation criteria for novel *Orthospovirus* species are defined by combining information about vector specificity,

host range, N protein serology, and N protein amino acid identity (which must be smaller than 90% in comparison with other previously described species) (King et al., 2011). The initial subdivision of the *Orthospovirus* species was based upon phylogenetic analysis of partial segments of the N protein, resulting in two geogroups: Old World (Asia) and New World (Americas) (Gilbertson et al., 2015). However, recent studies based on complete sequences of 22 *Orthospovirus* species shows that the division into geogroups is not consistent (Butković et al., 2021). The viruses were subsequently grouped into four phylogroups, with the open possibility to create new genera within each phylogroup, splitting the former monotypic *Orthospovirus* genus (Butković et al., 2021). Nowadays, 26 *Orthospovirus* species are recognized, and thus far seven of them were reported in Brazil (Oliveira et al., 2012). Groundnut ringspot orthospovirus (GRSV), tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV) and tomato chlorotic spot orthospovirus (TCSV) are the main orthospoviruses infecting vegetable crops in Neotropical areas. Sporadic infections of tomato and *Capsicum* by chrysanthemum stem necrosis orthospovirus – CSNV (**Figure 1**; Bezerra et al., 1999) have also been observed (Dianese et al., 2011).

**Symptoms induced by orthospoviruses** – Plants infected by orthospoviruses display a typical set of symptoms especially on leaves, stems, and fruits (**Figure 2**). Leaf and fruit symptoms usually consist of chlorotic (yellow) or necrotic (brown) ringspots. Tomato and sweet-pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits may be deformed, due to the production of necrotic sunken areas. Necrotic lesions may also be observed on stems. On young leaves, numerous small lesions may develop, given an appearance of bronzing and leaf curling (Lima et al., 2016). On lettuce, brown spots develop on leaves, followed by necrotic areas. Lettuce plants may become stunted and deformed, showing asymmetric leaf growth. Symptoms induced by TSWV, GRSV or TCSV are indistinguishable, giving no clear indication of which virus is involved.

*Orthospovirus* species can be precisely identified only by using serological and/or molecular methods.

**Vectors and epidemiology of the orthospoviruses** – *Orthospovirus* infect more than 1,000 monocotyledonous and dicotyledonous plants belonging to more than 82 botanical families. The orthospoviruses are transmitted mechanically (under experimental conditions) and, in natural conditions, by a limited number of thrips species (order *Thysanoptera*), in a circulative-propagative manner, replicating in both plant and invertebrate hosts (Rotenberg & Whitefield, 2018). Globally, *Frankliniella occidentalis* is the major orthospovirus vector species, but *F. schultzei* is also found in tomatoes in Brazil (Gilbertson et al., 2015). The life cycle of the vectors is composed of four stages, but only instars L1 and L2 are competent in virus acquisition. The viral particles are passed transstadially across life stages and the adult insect becomes a competent virus vector throughout its entire life. Seed transmission in many hosts remain uncertain (Rotenberg & Whitefield, 2018).

**Advances in horticultural plant breeding for resistance to orthospovirus-induced diseases** – Genetic resistance is the most promising control measure, being obtained by either conventional breeding methods or via biotechnology. Natural virus resistance is predominantly a qualitative (monogenic) trait in which expression is usually not affected by the environment (i.e., displays high heritability), even though some thermal instabilities have been detected. The incorporation/introgression of resistance factors depends upon the selection of individual plants via direct evaluation (resistant or susceptible) with and without controlled inoculations. In this regard, classical breeding methods such as mass selection, stratified mass selection, and backcrossing are usually very effective. The employment of MAS in the early stages is useful to accelerate and intensify the selection gains. Here, we will review the pathosystems, resistance

sources and, breeding strategies employed in the classical and biotech control of orthotospovirus-induced diseases in tomato, *Capsicum* species, and lettuce. The sections are organized according to the advances made in resistance breeding against orthotospovirus in each pathosystem.

### **Tomato breeding for resistance to *Orthotospovirus* species**

**Resistance to Orthotospovirus species in tomatoes** – The syndrome known as “vira-cabeça” is one of the most destructive viral diseases of tomatoes and major outbreaks have been reported since 1930s in Brazil (Kitajima, 2020). The predominant species causing “vira-cabeça” are GRSV, TSWV, and TCSV. Several sources of genetic resistance have been found in *Solanum* (*Lycopersicon* section), especially in the germplasm of the wild tomato species *S. peruvianum* (Gordillo et al., 2008; Dianese et al., 2011). The major resistance source thus far is the dominant *Sw-5b* gene (introgressed from a *S. peruvianum* accession), which confers broad-spectrum resistance to different orthotospoviruses and has been widely used in commercial breeding programs (Van Zijl et al., 1985; Stevens et al., 1992; Boiteux & Giordano, 1993; Roselló et al., 1998). The *Sw-5b* gene restricts systemic infection, and the inoculated leaves show a hypersensitivity response (Brommonschenkel et al., 2000). A novel resistance gene (named *Sw-7*) has been characterized (Qi et al., 2021), but it was not yet properly evaluated under Brazilian conditions.

**Viral outbreaks, germplasm screening, and classical breeding in tomatoes in Brazil** –The initial breeding efforts for orthotospovirus resistance in tomatoes were carried out by the Instituto Agronômico de Campinas (IAC) in the 1970s with a focus on the development of resistant fresh-market cultivars (Nagai, 1975; Lourenção et al., 1999). In the early 1990s, a

series of orthospovirus outbreaks caused a great economic and infrastructural crisis in the tomato processing industry sector in the Brazilian Northeast. In an attempt to minimize this crisis, Embrapa Vegetable Crops (CNPV) and the Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) established a joint breeding program, which resulted in the release of ‘Viradoro’, the first *Orthospovirus* resistant cultivar for processing in the country (Giordano et al., 2000). Despite its unquestionable utility, the *Sw-5b* gene displays some significant limitations viz.: (1) resistance expression may be adversely affected under either high inoculum pressure or does not express fully in regions where there are drastic fluctuations between day and night temperatures; (2) phenotypic expression does not show complete penetrance; and (3) some isolates may breakdown this resistance. For these reasons, a search for new sources of broad-spectrum has been carried out (Dianese et al., 2011). Alternatively, strategies of artificial evolution used in the *Sw-5b* gene lead to an improved resistance response to TSWV in tomatoes. The identification of key amino acid residues in the NSm protein followed by specific mutations improved defense against resistance-breaking TSWV isolates (Huang et al., 2021).

**Mechanisms of GRSV pathogenesis in tomatoes** – Thus far, only the dominant *Sw-5b* gene confers resistance to GRSV isolates. A comprehensive set of analyses of differentially expressed genes (DEGs) was carried out during a compatible interaction between *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’ and GRSV aiming to elucidate the mechanisms of GRSV pathogenesis. These DEGs were grouped into three major categories: “biological processes”, “molecular functions”, and “cellular components”. DEGs are involved in RNA silencing pathway as well as in association with cell signaling, photosynthetic processes (chloroplasts, thylakoids, and photosystems), endoplasmic reticulum, Golgi complex, plasmodesmata, elongation factors, and cellular detoxification were identified (Fontes, 2017).

**MAS for the *Sw-5b* gene in tomato breeding** – The locus encompassing the *Sw-5b* gene on

chromosome 9 was map-based cloned and it was found to reside within a cluster of five analogous copies of the same ancestral gene, named from *Sw-5a* to *Sw-5e* (Brommonschenkel et al., 2000; Spassova et al., 2001). The *Sw-5b* gene belongs to the class of resistance genes termed CC-(NB-ARC)-LRR (Brommonschenkel et al., 2000). A comprehensive set of analyses was also carried out demonstrating that *Sw-5b* is the single copy responsible for the resistance phenotype (Spassova et al., 2001; Oliveira et al., 2018). Studies carried out to elucidate the interaction of *Sw-5b* with viral proteins have shown that NSm (movement protein) is the *Avr*-determinant of *Sw-5b* gene (Hallwass et al., 2014; Peiro et al., 2014). The genomic information encompassing the *Sw-5b* locus enabled the development of a functional, locus-specific, and codominant molecular marker system that has been used in MAS worldwide (**Figure 3**; Dianese et al., 2010).

#### *Capsicum* breeding for resistance to *Orthotospovirus*

**Breeding programs for *Capsicum* resistance to orthotospovirus** – TSWV and GRSV also induce severe symptoms in all *Capsicum* species, causing serious economic losses. The first formal breeding initiative to develop *Capsicum* lines/cultivars with resistance to *Orthotospovirus* species in Brazil was initiated in the 1980s at Embrapa (Beek, 1987). Sources of resistance were identified in field and greenhouse screenings (Beek, 1987; Boiteux et al., 1993). *Capsicum chinense* ‘PI 159236’ displayed a typical HR with large local lesions upon mechanical inoculation with TSWV isolates (**Figure 4**). Inheritance studies indicate that a dominant allele (named *Tsw*) controls this HR only against TSWV isolates (Boiteux & Avila, 1994). However, the *Tsw*-mediated resistance was not effective to GRSV and TCSV isolates in mechanical inoculation assays (Boiteux, 1995). In addition, the *Tsw* gene has its effectiveness compromised when continuously exposed to temperatures above 32° C and plants heterozygous for the *Tsw* locus have lower levels of resistance in comparison with homozygous lines (Moury

et al., 1998).

**Isolation and marker-assisted selection (MAS) of the *Tsw* gene in *Capsicum*** – The *Tsw* allele was mapped to the distal portion of chromosome 10 and closely linked molecular markers were identified (Jahn et al., 2000). Later, the *Tsw* gene was map-based cloned and structural analyses indicated that it belongs to the class CC-NB-ARC-LRR of typical R-genes (Kim et al., 2017). Despite the similar action against orthotospovirus (especially TSWV), the *Tsw* and *Sw-5b* genes display substantial evolutionary differences with a very low amino acid identity (<15%). Moreover, *Tsw* can detect a distinct *Avr* factor, which is the NSs protein (de Ronde et al., 2013).

**Tsw-resistance breaking viral species and isolates** – As mentioned, the *Tsw* gene is not effective against GRSV and TCSV isolates, being highly effective only against Brazilian isolates of TSWV (**Figure 4**; Boiteux, 1995). However, many TSWV isolates able to overcome the *Tsw*-mediated resistance have been reported around the world (Kwon et al., 2021). The emergence of pathotypes that suppress *Tsw*-mediated resistance could be explained by positive selection in NSs protein as well the as reassortment of one or more genomic segments (Kwon et al., 2021).

### **Lettuce breeding for resistance to *Orthotospovirus***

**Classical breeding for *Orthotospovirus* resistance in lettuce** – Lettuce is one of the most important vegetables worldwide (Reyes-Chin-Wo et al., 2017). TSWV, GRSV and TCSV isolates have been reported infecting lettuce in Brazil (Colariccio et al., 2004; Fontes et al., 2019). Resistance to *Orthotospovirus* species in lettuce was reported initially by O'Malley & Hartmann (1989) in two accessions: 'PI 342517' (= 'Ancora') and 'PI 342444' (= 'Tinto').



These sources displayed partially dominant inheritance, and the resistance factors are more likely allelic (O'Malley & Hartmann, 1989). Additional sources of resistance to TSWV and impatiens necrotic spot virus (INSV) were detected in accessions of the wild lettuce species, such as *L. saligna*, *L. serriola*, *L. virosa*, and *L. inermis* (Cho et al., 1996; Simko et al., 2018). In the cultivated lettuce germplasm, promising levels of partial resistance to INSV were found in 'Amazona', 'Antigua', 'Commodore', 'Eruption', 'Iceberg', 'La Brillante', 'Merlot', and 'Telluride' (Simko et al., 2018). However, the highest levels of resistance to INSV reported thus far were detected in the accessions 'PI 342444' and 'PI 342517' (Simko et al., 2018).

**Lettuce breeding for *Orthospovirus* resistance in Brazil** – The pioneering initiative to develop lettuce cultivars with resistance to *Orthospovirus* species in Brazil was initiated in 1987 also in the IAC, São Paulo State (Nagai, 1989). The primary goal was to introduce resistance into cultivars of the 'Butterhead' morphotype by developing progenies from the cross 'Regina' x 'PI 342517' (Nagai, 1989). The accessions 'PI 342444' and 'PI 342517' were also identified as the most promising breeding sources of resistance in field assays conducted under natural inoculum conditions in Brazil (Pavan et al., 2008). These accessions displayed mild symptom expression, being consistently less severe than that of the susceptible standards (Nagai, 1989). However, there was no consistent indication to which *Orthospovirus* species these accessions were exposed in these assays. Fontes et al. (2019) mechanically inoculated lettuce seedlings of 'PI 342444' with seven isolates (three TSWV and four GRSV isolates). Severe symptoms and positive serological reactions were observed in the susceptible lettuce control (cultivar 'Vanda'), whereas 'PI 342444' plants did not exhibit symptoms after inoculation with TSWV isolates. In contrast, all GRSV-inoculated 'PI 342444' plants displayed early onset of severe symptoms, indicating that this resistance is not effective against this viral species. Therefore, an additional search for sources of genetic resistance in lettuce germplasm

effective against GRSV isolates is a major breeding priority under Brazilian conditions since it is currently the predominant lettuce-infecting orthotospovirus in the country.

**Potential application of transcriptomic analyses to study the interactions of GRSV and TSWV with lettuce cultivars** – Natural sources of genetic resistance to GRSV were not identified in lettuce germplasm thus far. Therefore, innovative approaches are necessary to solve this problem. One promising genetic strategy is identifying and editing pivotal “host susceptibility genes” utilized by the virus during infection. These host genes acting as facilitators during the infection process can be recognized by their altered levels of expression in RNAseq analyses (Puyam & Kaur, 2020), and can be targets of gene editing strategies (see below). A similar set of analyses is now underway in lettuce-GRSV pathosystem.

#### **Biotech breeding strategies for controlling *Orthotospovirus*-induced diseases.**

**Transgenic approaches** – Viral genes have been widely used in the development of resistant transgenic plants (= “pathogen-derived resistance”) and have been effective in different pathosystems (Goldbach et al., 2003). Constructs with viral genes encoding the RNA-dependent RNA polymerase, protease, movement protein, satellite, and defective RNAs in addition to non-coding regions of the viral genome have also been used with varying degrees of success. Initially, viral gene expression was presumed to be necessary for resistance to be effective. However, several results in recent years have shown that post-transcriptional gene silencing (PTGS) may occur, which does not require full gene expression.

**RNA gene silencing or RNAi** – Defense responses of plants triggered by viral pathogens generally uses RNA-mediated resistance. RNAi is a major basal defense against viral invasion

in plants. This mechanism is triggered by double-stranded RNA molecules (dsRNA), which are recognized and cleaved by a host Dicer-like ribonuclease (DCL) into 21–24-nucleotide short interfering RNAs (siRNAs). The siRNAs are recruited to a functional RNA-induced silencing complex (RISC) and then act as guides to direct them to their target viral RNA molecules, which have complementary sequences. As consequence, viral RNAs are degraded by the core components of RISC, which are members of the Argonaut (AGO) protein family (Ghildiyal & Zamore, 2009). This strategy has been used to develop transgenic plants resistant to begomoviruses (Aragão & Faria, 2009). Likewise, transgenic lettuce lines with potential GRSV resistance are under evaluation employing the RNA interference (RNAi) strategy, paving the way towards the biotech breeding development of novel anti-orthospovirus cultivars of this vegetable crop.

**Cisgenic strategy** – The mobilization of genes using genetic engineering techniques, both between different accessions/cultivars from a single species and across related species (= ‘cisgenesis’), may also be an interesting approach for controlling viral diseases (Jacobsen & Schouten, 2007). Resistance genes against pathogens with a wide host range (such as orthospoviruses) can be transferred across host varieties, wild species, or even from phylogenetically more distant taxonomic groups. For example, Picoli et al. (2006) used this strategy with success to transfer *Sw-5b* gene from tomato to the eggplant, generating plants with resistance to TCSV.

**Generation of loss-of-susceptibility mutations for control of orthospoviruses** – An example of susceptibility factors for genetic management of orthospoviruses is eukaryotic translation initiation factor EF1A that was able to inhibit TSWV replication, providing good levels of resistance via gene editing strategies in tomato (Hadidi et al., 2016). We have

employed transcriptomic analysis as a strategy for the discovery of loss-of-susceptibility genes to GRSV in tomatoes. DEGs were detected during a compatible interaction between the highly susceptible *S. lycopersicum* cultivar ‘Santa Clara’ and GRSV using Illumina technology (HiSeq 2500). Approximately 396 million reads were mapped to the tomato reference genome. A total of 2,344 DEGs were found in the Santa Clara-GRSV interaction when compared with the mock-inoculated controls. A total of 1,911; 268; and 416 DEGs were identified at the periods 0, 3–5, and 7–10 days after inoculation, respectively. This subset of DEGs may represent potential targets for biotech manipulation aiming to obtain cultivars with resistance to GRSV (Fontes, 2017).

### **FINAL CONSIDERATIONS**

Resistance to orthospoviruses and/or *Thysanoptera* vector species, when available, is the most feasible disease control strategy. Therefore, significant research effort has been devoted to this field. Great advances have been achieved using classical and molecular breeding. The biggest obstacle for the breeding programs is yet to identify and incorporate, on a large scale, multiple and/or large-spectrum resistance factors into elite lines of these vegetable crops as well as to anticipate potential problems with a novel, emerging orthospovirus-induced diseases.

## REFERENCES

- ADAMS, M.J. et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 162, p. 2505–2538, 2017.
- ARAGÃO, F.; FARIA, J. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 1086–1088, 2009.
- BEEK, M. A. **Breeding for Resistance to Diseases in Horticultural Crops**. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)/CATIE, 1987. 51 p.
- BEZERRA, I.C. et al. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, v. 89, p. 823–830, 1999.
- BOITEUX, L.S, et al. Sources of resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. **Euphytica**, v. 67, p. 89–94, 1993.
- BOITEUX, L.S. Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt virus in *Capsicum chinense*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 146–149, 1995.
- 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; 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.
- BOLLER, T.; FELIX, G.A. Renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 379–406, 2009.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., FRARY, A., TANKSLEY, S.D. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance

gene *Mi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1130–1138, 2000.

BUTKOVIĆ, A.; GONZÁLEZ, R.; ELENA, S.F. Revisiting *Orthospovirus* phylogeny using full-genome data and testing the contribution of selection, recombination and segment reassortment in the origin of members of new species. **Archives of Virology**, v. 166, p. 491–499, 2021.

CALIL, I.P; FONTES, E.P.B. Plant immunity against viruses: Antiviral immune receptors in focus. **Annals of Botany**, v. 119, p.711–723, 2016.

CHO, J.J. et al. Conventional breeding: Host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to Tomato spotted wilt virus in vegetables. **Acta Horticulturae**, v. 431, p. 367–378, 1996.

CHOI, H.W.; KLESSIG, D.F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. **BMC Plant Biology**, v. 16, p. 1–10, 2016.

COLARICCIO, A. et al. Tomato chlorotic spot virus (TCSV) in hydroponic-grown lettuce in São Paulo state, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.307–311, 2004.

COOPER J.I.; JONES, A.T. Responses of plant to viruses: Proposals for the use of terms. **Phytopathology**, v. 73, p. 127–128, 1983.

DE RONDE, D. et al. *Tsw* gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, p. 405–415, 2013.

DE RONDE, D.; BUTTERBACH, P.; KORMELINK, R. Dominant resistance against plant viruses. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 307, 2014.

DIANESE, E.C. et al. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. **Molecular Breeding**, v. 25, p. 133–142, 2010.

DIANESE, E.C. et al. Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for new sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species. **Euphytica**, v. 180, p. 307–319, 2011.

DODDS P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Review Genetics**, v. 11, p. 439–548, 2010.

FONTES, M.G. **Estudo da interação tospovírus–tomateiro: análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de groundnut ringspot virus (GRSV)**. 2017. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília. 214 p.

FONTES, M.G. et al. Phenotypic expression and species-specific reaction of *Lactuca sativa* ‘PI 342444’ to groundnut ringspot virus (GRSV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 231–238, 2019.

FRASER, R.S.S. The genetics of resistance to plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 179–200, 1992.

GARCIA-RUIZ, H. Susceptibility genes to plant viruses. **Viruses**, v. 10, p. 484, 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.001143>

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P.D. Small silencing RNAs: An expanding universe. **Nature Review Genetics**, v.10, p. 94–108, 2009.

GILBERTSON, R.L. et al. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review of Virology**, v. 2, p. 67–93, 2015.

GIORDANO, L.B. et al. ‘Viradoro’: A tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. **HortScience**, v.35, p.1368–1370, 2000.

GOLDBACH, R.; BUCHER, E.; PRINS, M. Resistance mechanisms to plant viruses: An overview. **Virus Research**, v. 92, p. 207–212, 2003.

GÓMEZ, P. et al. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 1–22, 2009.

GORDILLO, L.F. et al. Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to tomato spotted wilt virus. **Plant Disease**, v. 92, p. 694–704, 2008.

HADIDI, A. et al. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1325, 2016.

HALLWASS, M. et al. The tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NSm) triggers a hypersensitive response in *Sw-5*-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional *Sw-5b* resistance gene copy. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, p. 871–880, 2014.

HOU, S. et al. Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 646, 2019.

HUANG, H. et al. Stepwise artificial evolution of a *Sw-5b* immune receptor extends its resistance spectrum against resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. **Plant Biotechnology Journal**, v.19, p. 2164–2176, 2021.

JACOBSEN, E; SCHOUTEN, H. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. **Trends in Biotechnology**, v. 25, p. 219–223, 2007.

JAHN, M. et al. Genetic mapping of the *Tsw* locus for resistance to the Tospovirus *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum* spp. and its relationship to the *Sw-5* gene for resistance to the same pathogen in tomato. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.13, p. 673–682, 2000.

JONES, J.; DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, 2006.

JORGE, T.S.; LIMA, M.F.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; KITAJIMA, E.W. First report of *Cichorium endivia* (Asteraceae) as a natural host of groundnut ringspot orthotospovirus in Brazil. **Plant Disease**, v. 105, p. 714, 2021.



JORGE, T.S.; FONTES, M.G.; LIMA, M.F.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; KITAJIMA, E.W. Natural infection of *Cichorium intybus* (Asteraceae) by groundnut ringspot virus (genus *Orthotospovirus*) isolates in Brazil. **Plant Disease**, v. 106, p. 2005, 2022.

KIM, S.B. et al. Divergent evolution of multiple virus-resistance genes from a progenitor in *Capsicum* spp. **New Phytologist**, v. 213, p. 886–899, 2017.

KING, A.M. et al. **Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier, 2011.

KITAJIMA, E.W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, v. 20, p. e20190932, 2020.

KORMELINK, R. et al. The *Bunyavirales*: The plant-infecting counterparts. **Viruses**, v.13, p. 842, 2021.

KWON, S.J. et al. Resistance-breaking tomato spotted wilt virus variant that recently occurred in pepper in South Korea is a genetic reassortant. **Plant Disease**, v. 105, p. 2771–2775, 2021.

LIMA, M. et al. Doença vira-cabeça em alface: Sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica**, 2016. 16p.

LIU, S-R et al. MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1801, 2017.

LOURENÇÃO, A. L. et al. Resistência de linhagens avançadas de tomateiro a tospovírus. **Bragantia**, v. 58, p. 293–303, 1999.

MOURY, B. et al. High temperature effects on hypersensitive resistance to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 489–498, 1998.

NAGAI, H. Resistência ao vírus de vira-cabeça em tomateiro derivado do cruzamento entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum*. **Revista de Olericultura**, v.15, p. 22–23,

1975.

NAGAI, H. PI 342517, uma introdução de alface com resistência ao vírus de vira cabeça. **Horticultura Brasileira**, v. 7, p. 66, 1989.

OLIVEIRA, A.S. et al. Characterization of bean necrotic mosaic virus: a member of a novel evolutionary lineage within the genus *Tospovirus*. **PLoS One**, v. 7, e38634, 2012.

OLIVEIRA, A.S. et al. The *Sw-5* gene cluster: Tomato breeding and research toward orthotospovirus disease control. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1055, 2018.

O'MALLEY, P.J; HARTMANN R.W. Resistance to tomato spotted wilt virus in lettuce. **HortScience**, v. 24, p. 360–362, 1989.

PAPPU, H.R.; JONES, R.A.C.; JAIN, R.K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**, v. 141, p. 219–236, 2009.

PAVAN, S. et el. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. **Molecular Breeding**, v. 25, p. 1–12, 2010.

PAVAN, M. A. et al. Virus diseases of lettuce in Brazil. **Plant Viruses**, v. 2, p. 35–41, 2008.

PEIRO, A. et al. The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, p. 802–813, 2014.

PENG, Y.; VAN WERSCH, R.; ZHANG, Y. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, p. 403–409, 2018.

PICOLI, E.A.T. et al. Resistance gene *Sw-5* of tomato confers resistance to TCSV in *Solanum melongena*. **International Journal of Horticultural Sciences**, v.12, p. 41–47, 2006.

QI, S. et al. Natural resources resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in tomato (*Solanum lycopersicum*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, e10978. 2021.

REYES-CHIN-WO, S. et al. Genome assembly with in vitro proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. **Nature Communications**, v.8, e14953, 2017.

ROSELLÓ, S.; DÍEZ, M.J.; NUEZ, F. Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p. 499–509, 1998.

ROTENBERG, D.; WHITFIELD, A. E. Molecular interactions between tospoviruses and thrips vectors. *Current Opinion in Virology*, v. 33, p. 191–197, 2018.

RYBICKI, E.P.A. Top ten list for economically important plant viruses. **Archives of Virology**, v. 160, p. 17–20, 2015.

SIMKO, I.; RICHARDSON, C.E.; WINTERMANTEL, W.M. Variation within *Lactuca* spp. for resistance to impatiens necrotic spot virus. **Plant Disease**, v. 102, p. 341–348, 2018.

SPASSOVA et al. The tomato gene *Sw5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. **Molecular Breeding**, v.7, p. 151–161, 2001.

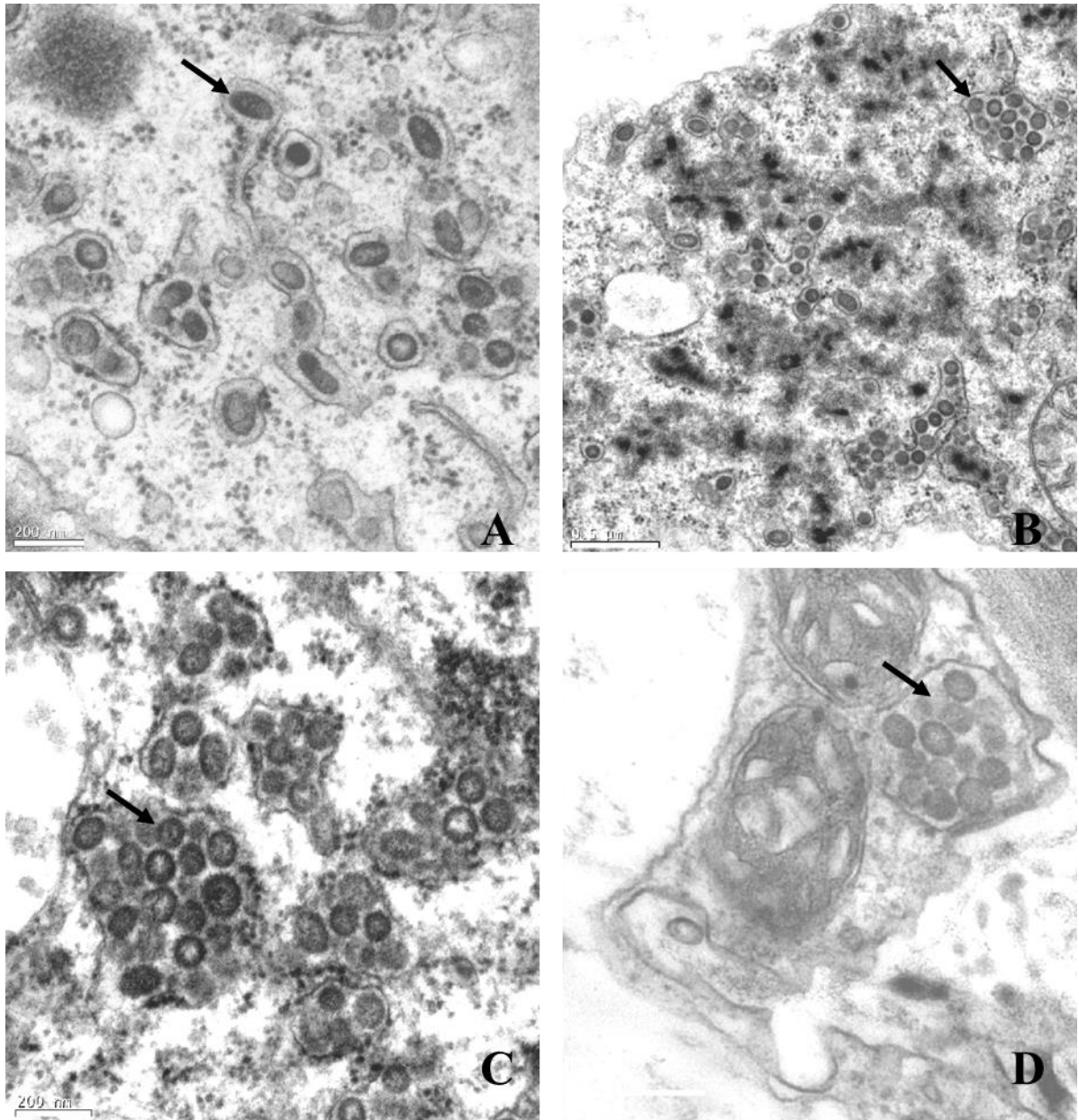
STEVENS, M.R.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, v. 59, p. 9–17, 1992.

TEIXEIRA, R. M. et al. Virus perception at the cell surface: revisiting the roles of receptor-like kinases as viral pattern recognition receptors. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, p. 1196–1202, 2019.

VAN ZIJL, J.J.B.; BOSCH, S.E.; COETZEE, C.P.J. Breeding tomatoes for processing in South Africa. **Acta Horticulturae**, v. 194. p. 69–76, 1985.

ZHAO, S.; LI, Y. Current understanding of the interplays between host hormones and plant viral infections. **PLoS Pathogens**, v. 17, e1009242, 2021.

ZIPFEL, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, p. 10–16, 2008.

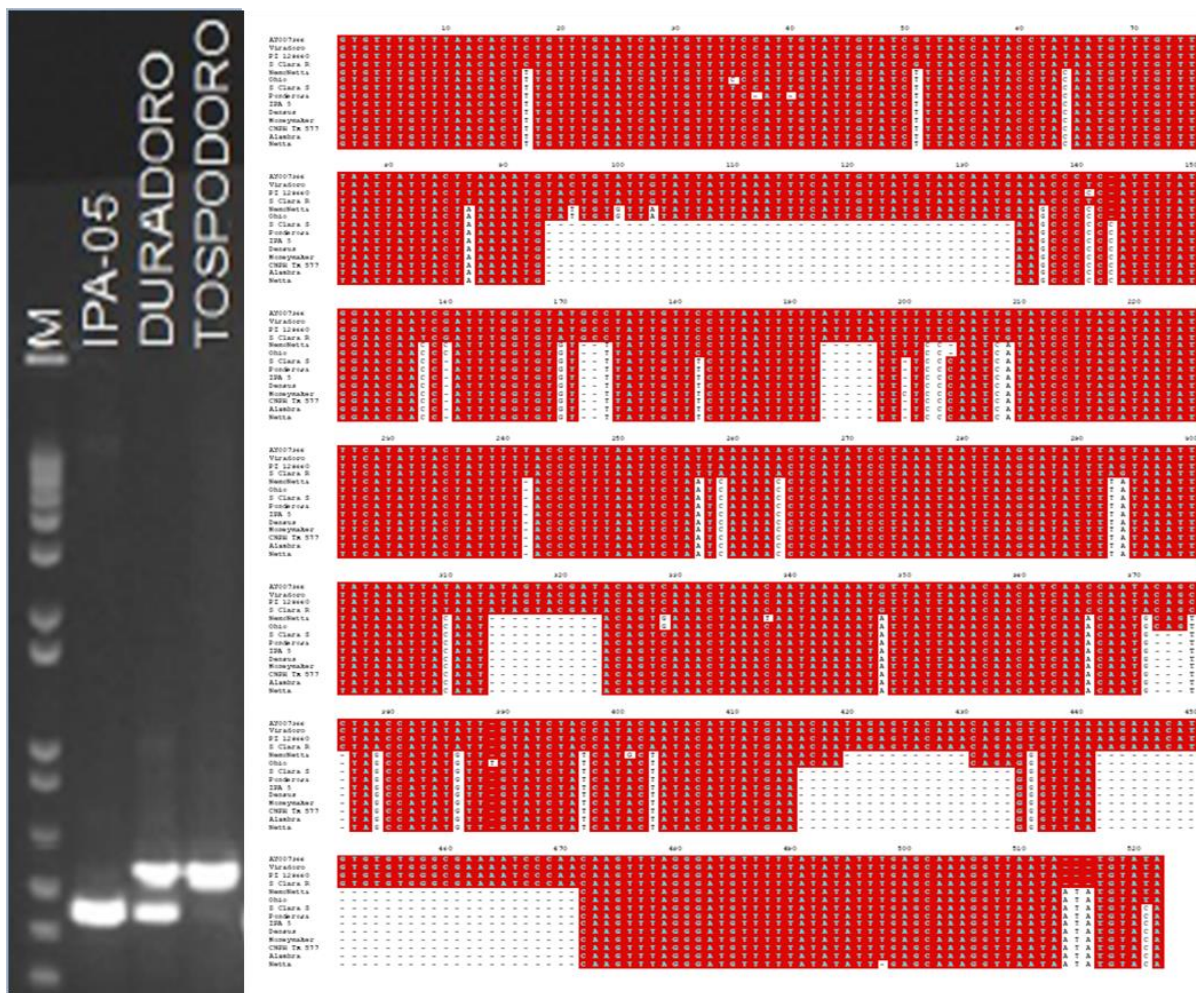


**Figure 1** – Transmission electron micrographs of foliar tissues of different host plants infected with orthospoviruses. **A** = tomato (*Solanum lycopersicum* L.) infected by tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV); **B** = Leaf chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae) infected with groundnut ringspot orthospovirus – GRSV (Jorge et al., 2022); **C** = Chicory (*Cichorium endivia* L., Asteraceae) infected by GRSV (Jorge et al., 2021), and **D** = bell-pepper (*Capsicum annuum* L.) infected with chrysanthemum stem necrosis orthospovirus – CSNV. Arrows indicate orthospoviruses particles. **Source:** Elliot Watanabe Kitajima.



**Figure 2** – Foliar and fruit symptoms induced by orthospoviruses in **tomatoes** (left panel), in *Capsicum* species (central panel), and in **lettuce** (right panel). **Sources:** Mirtes F. Lima, Tiago S. Jorge, and Leonardo S. Boiteux.





**Figure 3 – Left Panel:** Agarose gel displaying the amplicon profiles of a codominant marker system for the *Sw-5b* locus in tomato; IPA-5 (susceptible cultivar; *sw-5b/sw-5b*), ‘Duradoro’ (heterozygous hybrid; *Sw-5b/sw-5b*) and ‘Tospodoro’ (homozygous dominant; *Sw-5b/Sw-5b*); M = 100 bp size marker. **Right Panel:** Sequence alignment encompassing the region of *Sw-5b* locus amplified by the PCR primers reported by Dianese et al. (2010). Nucleotides in red are conserved across 14 distinct tomato accessions; whereas nucleotides in the white boxes are mutations and (-) signals are indicating nucleotide deletions. The susceptible allele displays a larger number of insertion/deletion (INDELs) in comparison with the genomic region of the resistance accessions (the first four lines in the top of the panel). **Source:** Maria Esther de Noronha Fonseca.



**Figure 4** – Mechanical inoculation of the accession *Capsicum chinense* ‘PI 159236’ with tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV) and groundnut ringspot orthospovirus (GRSV) isolates. The accession ‘PI 159236’ is the source of the dominant allele *Tsw*, which controls a typical hypersensitive response with large local lesions upon mechanical inoculation with TSWV isolates (left plant in the **Panel A** and **Panel B**). However, the *Tsw*-mediated resistance is not effective against GRSV and tomato chlorotic spot orthospovirus (TCSV) isolates, displaying systemic infection (right plant in the **Panel A**). **Sources:** Leonardo S. Boiteux and Tiago S. Jorge.



## **CAPÍTULO 3**

**ENSAIOS DE CAMPO COM EXPOSIÇÃO NATURAL AO VETOR E  
TESTES DE TRANSMISSÃO MECÂNICA EM CASA DE  
VEGETAÇÃO PARA DETECÇÃO DE FONTES ESTÁVEIS DE  
RESISTÊNCIA A ORTHOTOSPOVIRUS EM GERMOPLASMA  
DE *Lactuca***

**Ensaio de campo com exposição natural ao vetor e testes de transmissão mecânica em casa de vegetação para detecção de fontes estáveis de resistência a orthospovirus em germoplasma de *Lactuca*.**

**Tiago Silva Jorge<sup>1</sup>; Mirtes Freitas Lima<sup>3</sup>; Cleia dos Santos Cabral<sup>2</sup>; Maria Geane Fontes<sup>1</sup>; Águeda Gonçalves Tavares<sup>3</sup>; Marcelo Vivas<sup>4</sup>; Maria Esther de Noronha Fonseca<sup>3</sup>; Leonardo Silva Boiteux<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>University of Brasilia (UnB), Institute of Biological Sciences, 70910-900, Brasília-DF, Brazil.

<sup>2</sup>UPIS, 70390-125, Brasília-DF, Brazil.

<sup>3</sup>Embrapa Vegetable Crops (Embrapa Hortaliças), National Center for Vegetable Crops Research (CNPQ), 70275-970, Brasília-DF, Brazil.

<sup>4</sup>Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Center for Agricultural Sciences and Technologies, 28013-602, Campos dos Goytacazes-RJ, Brazil.

## RESUMO

A doença ‘vira-cabeça’ (induzida por diferentes membros do gênero *Orthospovirus*) é um dos principais problemas bióticos da alface (*Lactuca sativa* L.) na América do Sul. A resistência genética é a alternativa de manejo mais promissora devido à ausência de métodos de controle curativos e à ineficácia dos métodos disponíveis para controlar os insetos vetores. Até agora, apenas fontes de resistência ao *Orthospovirus tomatomaculae* (TSWV) e *Orthospovirus impatiensnecromaculae* (INSV) foram previamente detectadas no gênero *Lactuca* na Califórnia. No entanto, essas fontes se mostraram ineficazes contra isolados de *Orthospovirus arachianuli* (GRSV), que é a principal espécie nas regiões neotropicais. Nesse contexto, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a reação de uma coleção de germoplasma composta de 65 acessos de *Lactuca* contra isolados de GRSV e TSWV tanto em condições de campo aberto quanto por meio de inoculações mecânicas em casa de vegetação. Quatorze acessos apresentaram níveis de incidência abaixo de 20% em condições de campo aberto e foram selecionados para um conjunto de experimentos usando inoculação mecânica controlada com três isolados de GRSV e dois de TSWV. Três acessos apresentaram valores de incidência significativamente menores para GRSV e TSWV. No entanto, nenhuma fonte estável de imunidade foi detectada para GRSV. Este é o primeiro estudo relatando a detecção de fontes de resistência simultânea contra isolados de GRSV e TSWV, representando potenciais doadores de fatores de resistência contra orthospovirus para incorporação em linhagens e cultivares elite de alface.

**Palavras-chaves:** Resistência genética, GRSV, alface, TSWV.

## ABSTRACT

**Field trials with natural exposure to the vector and mechanical transmission tests under greenhouse conditions to detect stable sources of resistance to orthospoviruses in *Lactuca* germplasm.**

The ‘spotted wilt’ disease (induced by different members of the genus *Orthospovirus*) is one of the main biotic problems of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in South America. Genetic resistance is the most promising management alternative due to the absence of curative control methods and the ineffectiveness of available methods to control the insect vectors. So far, only sources of resistance to *Orthospovirus tomatomaculae* (TSWV) and *Orthospovirus impatiensnecromaculae* (INSV) have been detected in the genus *Lactuca* in California. However, these sources proved to be ineffective against isolates of *Orthospovirus arachianuli* (GRSV) which is the main orthospovirus in neotropical regions. In this context, the main objective of the present work was to evaluate the reaction to GRSV and TSWV isolates of a germplasm collection composed of 65 accessions of *Lactuca* under open-field conditions (natural inoculum) and in mechanical inoculation tests under greenhouse conditions. Fourteen accessions displayed levels of incidence below 20% under open-field conditions and were selected for a set of experiments using controlled mechanical inoculation with three GRSV and two TSWV isolates. Three accessions displayed significantly lower incidence values for GRSV and TSWV. However, no stable source of immunity was detected for GRSV. This is the first study reporting the detection of sources of simultaneous resistance against GRSV and TSWV isolates, thus representing important donors of orthospovirus resistance factors for incorporation into elite inbred lines and cultivars of lettuce.

**Keywords:** Genetic resistance, GRSV, Lettuce, TSWV.

## INTRODUÇÃO

Membros do gênero *Orthospovirus* ocasionam enorme impacto negativo na produção agrícola, sendo responsáveis por perdas significativas em uma ampla gama de plantas hospedeiras (Rybicki 2015). Membros do gênero *Orthospovirus* são vírus de RNA de fita simples, possuindo partículas esféricas e envelopadas com genoma tri-segmentado classificados de acordo com seus respectivos tamanhos em Large – L ( $\approx$  9kb), Medium – M ( $\approx$  4,8kb) e Small – S ( $\approx$  2,9kb). O segmento RNA-S é ambisenso, sendo um precursor da proteína do nucleocapsídeo (N) e uma proteína não-estrutural supressora de silenciamento gênico (NSs). O segmento RNA-M também é ambisenso, sendo precursor da proteína não estrutural relacionada com o movimento viral (NSm) e das glicoproteínas GN/GC. O segmento RNA-L codifica uma polimerase dependente de RNA (RdRp), com polaridade negativa (Kormelink et al. 2021). Os orthospovirus são transmitidos naturalmente por insetos da Ordem *Thysanoptera* em uma relação de transmissão circulativa-propagativa (Rotenberg and Whitefield 2018). *Frankliniella occidentalis* é o vetor mais importante, tendo atualmente uma distribuição cosmopolita (He et al., 2020). Sete espécies de *Orthospovirus* já foram relatadas no Brasil, sendo membros das espécies *Orthospovirus tomatomaculae* (TSWV), *Orthospovirus tomatoflavi* (TCSV) e *Orthospovirus arachianuli* (GRSV) predominantes em hortaliças e plantas invasoras nas condições brasileiras (Costa & Forster 1941; Duarte et al. 1995; Nagata et al. 1998; Pozzer et al. 1999; Martinez et al. 2019; Kitajima 2020). Os sintomas induzidos por TSWV, GRSV ou TCSV são indistinguíveis, não fornecendo nenhuma indicação clara de qual espécie estaria envolvida nos diferentes patossistemas, demandando análises sorológicas e/ou métodos moleculares para identificação adequada dos patógenos envolvidos (Jorge et al. 2023).

A doença denominada ‘vira-cabeça’ (induzida por um complexo de membros do gênero *Orthospovirus*) é um dos principais problemas para a produção de alface (*Lactuca sativa* L.) no Brasil (Colariccio et al. 2004; Lima et al. 2016) bem como na região do Cone Sul da América do Sul (Gracia et al., 1999). O quadro sintomatológico típico em alface envolve o aparecimento de manchas ou pontuações marrons nas folhas, seguidas de áreas necróticas mais amplas, que podem ocasionar crescimento foliar assimétrico e deixar as plantas afetadas raquíticas e deformadas (Lima et al. 2016). Os surtos epidêmicos são frequentes durante o inverno seco e as estações quentes/chuvosas, com perdas de rendimento podendo alcançar até 100% em plantações de campo aberto e 40% em cultivo hidropônico (Colariccio et al. 2004; Lima et al. 2016).

Um isolado de um membro da espécie GRSV foi inicialmente relatada na África infectando leguminosas se espalhando posteriormente para diferentes países da América do Sul, América do Norte e Ásia e afetando uma ampla gama de plantas hospedeiras (de Avila et al. 1993; Pietersen & Morris 2002; Ding et al. 2004; De Breuil et al. 2008; Webster et al. 2010; 2011; 2015; Appiah et al. 2016; Fontes et al., 2018; 2019b; Esquivel et al. 2019; Zhang et al. 2021). Isolados de membros das espécies TSWV, TCSV e GRSV já foram relatados infectando alface e outras espécies da família Asteraceae na América do Sul (Gracia et al., 1999; Colariccio et al. 2004; Lima et al. 2016; Fontes et al., 2019; Jorge et al. 2021; Jorge et al. 2022). No entanto, levantamentos regionais mais extensos indicam que o GRSV é o principal orthospovirus disseminado no Brasil (Lima et al., 2016; Martinez et al. 2019) e na Argentina (Gracia et al., 1999).

Devido à falta de métodos de controle curativos, o manejo de doenças induzidas por membros do gênero *Orthospovirus* é complexo, sendo a resistência genética o método mais prático,

eficiente e sustentável (Jorge et. al 2023). Fontes de resistência a orthospovirus foram relatadas no tomateiro e em *Capsicum* (Jorge et. al., 2023). Resistência em acessos de tomateiro conferida pelo gene *Sw-5b* apresenta um amplo espectro de eficiência (Boiteux & Giordano 1993; Dianese et al. 2011). Por outro lado, a resistência conferida pelo gene *Tsw* de *C. chinense* é eficaz apenas contra isolados de TSWV (Boiteux et al. 1993; Boiteux & de Ávila 1994; Boiteux 1995). Em alface, fontes parcialmente dominantes de resistência ao TSWV foram relatadas nos acessos ‘PI 342517’ e ‘PI 342444’ (O’Malley & Hartmann 1989). Progenies de cruzamentos ‘PI 342517’ x ‘PI 342444’ apresentaram níveis de resistência semelhantes aos dois genitores, indicando que os fatores de resistência em ambos os acessos são mais provavelmente idênticos ou alélicos (O’Malley & Hartmann 1989). Outras fontes de resistência foram relatadas contra TSWV e isolados de Impatiens necrotic spot virus (INSV) em uma coleção de germoplasma de espécies *Lactuca* selvagens e cultivadas avaliada nos Estados Unidos (Cho et al. 1996; Simko et al. 2018). Um pedido de patente relatou a obtenção de plantas de alface resistentes a TSWV e INSV, sendo a resistência conferida por um gene recessivo possivelmente presente no cromossomo 2 da alface (Schut et al. 2014).

Os programas de melhoramento para resistência a membros do gênero *Orthospovirus* no Brasil começaram na década de 1980 (Nagai 1989). Os acessos ‘PI 342444’ e ‘PI 342517’ também foram identificados como as fontes mais promissoras de resistência quando avaliados em condições de campo aberto e com inóculo natural na região Sudeste do Brasil (Nagai 1989; Guimarães et al. 2009). No entanto, informações não estão disponíveis para quais membros do gênero *Orthospovirus* esses acessos foram avaliados nesses trabalhos. Posteriormente, ensaios de inoculação mecânica com isolados de TSWV e GRSV demonstraram que a resistência no acesso ‘PI 342444’ era espécie-específica, funcionando apenas contra isolados de TSWV (Fontes et al. 2019a). Sintomas severos típicos da doença e reações sorológicas ao

antissoro policlonal contra GRSV foram observados em todas as plantas do acesso ‘PI 342444’ quando inoculadas mecanicamente com os isolados do vírus GRSV (Fontes et al. 2019a). Assim, estudos adicionais em busca de novas fontes de resistência genética em germoplasma de alface simultaneamente eficazes contra isolados de GRSV e TSWV é uma das principais prioridades para o melhoramento clássico dessa cultura nas condições brasileiras. De fato, ações de melhoramento genético para resistência ao GRSV são essenciais, pois, como mencionado, representa o principal orthospovirus afetando a alface no Brasil e em todo o Cone Sul da América do Sul (Gracia et al., 1999; De Breuil et al. 2008; Esquivel et al 2019; Martinez et al. 2019). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar uma coleção de acessos de *Lactuca* (com ampla base genética) tanto em condições de inoculação natural (experimentos de campo aberto) quanto em condições de casa de vegetação (em experimentos de inoculação mecânica) visando identificar potenciais novas fontes estáveis de resistência contra dois dos principais orthospovirus neotropicais.

## MATERIAL & MÉTODOS

**Ensaio de campo** – Foi realizado um experimento de campo entre os meses de julho e setembro de 2018, na fazenda experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPQ), Distrito Federal, Brasil. Foram avaliados 65 acessos de alface pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do CNPH, composto por cultivares, materiais silvestres ou acessos em processo de melhoramento (**Tabela 1**). A cultivar ‘Vanda’ foi utilizada como testemunha (controle) suscetível a diferentes membros de espécies de orthospovirus.

**Produção das mudas e montagem do experimento** – As mudas de alface foram produzidas em bandejas de isopor contendo substrato comercial Basaplant e um adubo de dissociação lenta (Osmocote® 15N-9P-12K). Plantas foram levadas a campo com dez dias após germinação. O



delineamento experimental adotado foi blocos casualizados, com duas repetições, e oito plantas por parcela experimental. Para aumentar as chances de sucesso na inoculação natural, o experimento foi instalado nas proximidades de uma área de tomate suscetível em início de ciclo com alta incidência natural de isolados de orthotospovirus e infestação por tripses.

**Avaliação do experimento de campo e análise estatística** – O número de plantas com sintomas foi avaliado pela contagem do número de planta sintomáticas, 30 dias após o transplante das mudas para o campo e, após 45 dias, foi realizada a amostragem de folhas novas para análises sorológicas no laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Hortaliças. O método utilizado foi dot-ELISA ou NCM-ELISA (*Nitrocelulose membrane-enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando antissoros policlonais produzidos contra a capa proteica de membros das três principais espécies que acometem a cultura da alface no Brasil GRSV, TSWV e TCSV. Os dados de incidência da doença nas plantas foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e a seleção dos melhores materiais baseada em estatística descritiva. Todas as análises foram realizadas no ambiente R, utilizando-se os pacotes biotools, ggtree, multivariate analysis e phangorn (Schliep 2011; da Silva 2017; Yu 2018; Azevedo 2021).

**Experimentos de casa de vegetação** – Foram conduzidos cinco bioensaios em casa vegetação utilizando diferentes isolados de GRSV (3) e TSWV (2) originalmente obtidos de plantas de alface sintomáticas procedente de diferentes regiões do Brasil (**Tabela 2**). Os isolados foram caracterizados biologicamente utilizando as hospedeiras experimentais *Chenopodium quinoa* e um acesso de *Capsicum chinense* (PI159236) contendo o gene de resistência *Tsw* (Boiteux & de Ávila 1994; Boiteux 1995). A caracterização sorológica foi realizada via dot-ELISA utilizando antissoros policlonais específicos produzidos no laboratório de virologia vegetal da Embrapa Hortaliças. A caracterização molecular foi realizada extraindo-se o RNA total das

amostras originais usando o reagente TRIzol (Ambion), seguindo o protocolo laboratorial. Posteriormente foi realizada a RT-PCR one step utilizando o kit AccessQuick™ (Promega) com primers específicos para as sequências de nucleotídeos de membros das espécies GRSV, TSWV e TCSV. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% (Adkins et al 2002, Webster et al. 2011, Webster et al. 2013). A produção de mudas foi realizada em bandejas de isopor contendo substrato comercial Basaplant acrescentado o adubo Osmocote® e após 10 dias, as mudas foram transplantadas para vasos de 300 mL de capacidade contendo mistura de solo autoclavado e adubo. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental com blocos casualizados com três blocos e parcelas experimentais de cinco plantas cada. A cultivar ‘Vanda’ e plantas indicadoras *Datura stramonium* e *Nicotiana rustica* foram utilizadas como controles positivos para os isolados TSWV e GRSV.

**Produção do inóculo, inoculação e avaliação em condições de casa de vegetação** – O inóculo foi produzido em plantas de *D. stramonium* inoculadas com auxílio do abrasivo carborundum (600 mesh) e extrato preparado pela maceração de folhas de alface (1g) infectadas com cada um dos isolados já caracterizados em 10 mL de tampão fosfato 0.01 M pH 7.4 acrescido de 0.1 % sulfito de sódio. As mudas de alface foram inoculadas após a expansão completa do primeiro par de folhas verdadeiras. O inóculo foi preparado macerando 1g de folhas de sintomáticas de *D. stramonium* em 10 mL de tampão fosfato 0.01 M pH 7.4 acrescido de 0.1 % de sulfito de sódio. O processo de inoculação foi repetido 48 horas após a primeira inoculação visando reduzir a ocorrência de escapes (Boiteux & de Ávila 1994). Três semanas após a inoculação foi avaliada a taxa de infecção coletando-se folhas novas para a realização de teste sorológico dot-ELISA. Plantas de *D. stramonium* e *N. rustica* inoculadas foram utilizadas como controle positivo para monitorar a viabilidade dos isolados, e plantas de tomate com o gene *Sw-5b* foram

os controles negativos. Temperaturas do ar foram registradas durante todo o período do experimento em casa de vegetação (**Figura 1**).

**Análise estatística** – Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância multivariada e foi realizado o teste de Pillai para verificação da significância. Para mensurar a diversidade genética entre os acessos foi obtida uma matriz com a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) (De Maesschalck et al. 2000). A partir da matriz  $D^2$ , o agrupamento hierárquico utilizado foi selecionado com base nos maiores valores do coeficiente de correlação cofenética, tamanho amostral e verificação da significância pelo teste de Mantel (Lapointe & Legendre 1995; Saraçlı et al. 2013). O ponto de corte do agrupamento hierárquico foi estimado pelo teste de Mojena (1977). Todas as análises foram realizadas no ambiente R, utilizando-se os pacotes biotools, ggtree, multivariate analysis e phangorn (Schliep 2011; da Silva 2017; Yu 2018; Azevedo 2021).

## RESULTADOS

**Seleção dos acessos com menores níveis de incidência em condições de inoculo natural em campo** – No ensaio conduzido em condições de campo sob inoculo natural de GRSV (**Figura 2**), todos os acessos avaliados apresentaram plantas infectadas, com níveis de incidência com variação de 5–85% (**Figura 3**). Os sintomas observados nas plantas sintomáticas foram manchas necróticas pequenas, anéis cloróticos e anéis necróticos, crescimento assimétrico. Foram detectados em todas as amostras de plantas com sintomas típicos da doença, coletadas no experimento de campo apenas isolados de GRSV, como indicado por meio da utilização de testes sorológicos (dot-ELISA) com antissoros específicos. Os dados de incidência de GRSV foram submetidos à análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis e apresentaram significância para os acessos testados quanto a incidência da doença. Dos 65 acessos avaliados

em condição de campo, 14 acessos apresentaram níveis de incidência abaixo de 20%. Esses acessos foram selecionados para ensaios subsequentes de inoculação mecânica em condições de casa de vegetação.

**Avaliação através de bioensaios inoculação mecânica com isolados de GRSV e TSWV em casa de vegetação dos acessos de *Lactuca* mais promissores em condições de campo –**

Problemas com a germinação de sementes foram recorrentes mesmo utilizando-se diferentes técnicas para a quebra de dormência das sementes, o que pode ocorrer em alface, possibilitando que apenas os acessos ‘La Brillante’, ‘Dandie’, ‘Regina’, ‘Autumn Gold’, ‘Vanda’, ‘UC12101’, ‘Belíssimo’, ‘Bedford’, ‘Ithaca’, ‘Caipira’ e ‘Colorado’ fossem avaliados nos experimentos de casa de vegetação. Todos os isolados de orthospovirus, empregados nos ensaios de inoculação, induziram sintomas em subgrupos de acessos, com incidência variando entre 0 a 100% de acordo com a combinação acesso x isolado. Os isolados de GRSV induziram níveis maiores de incidência quando comparados aos isolados de TSWV. Comparando os isolados de uma mesma espécie viral, o isolado GRSV-28 apresentou as maiores porcentagens de incidência, enquanto para TSWV o isolado TSWV-13 foi capaz de induzir maiores níveis de incidência de plantas sintomáticas. Os acessos inoculados com o isolado GRSV-28 apresentaram as maiores porcentagens de incidência quando comparados a outros isolados, com valores variando entre 30 e 100% de incidência.

**Divergência genética em resposta a inoculação com diferentes isolados de orthospovirus em condições controladas –**

Os dados de incidência submetidos a análise de variância multivariada apresentaram diferenças estatísticas segundo teste de Pillai. O agrupamento hierárquico selecionado para a confecção do dendrograma foi Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) que apresentou os maiores valores de coeficiente cofenético

validados pelo teste de Mantel com 999 permutações. O ponto de corte estimado pelo teste de Mojena foi  $k=1.25$ , que permitiu o estabelecimento de dois grupos de acessos sendo: **Grupo #1:** Composto pelos acessos com maiores níveis de tolerância à doença – ‘Bedford’, ‘Belíssimo’ e ‘UC1210’ e **Grupo #2:** Composto pelos oito acessos de *L. sativa* restantes (**Figura 4**).

## DISCUSSÃO

O desenvolvimento de cultivares convencionais com resistência genética à orthotospovirus é uma das principais demandas do melhoramento clássico visando resistência em alface. Até o momento não existem relatos na literatura sobre acessos de alface que possuam resistência genética contra isolados de GRSV, sendo conhecido fontes apenas para as espécies TSWV e INSV (O’Malley & Hartmann 1989; Cho et al. 1996; Schut et al. 2014; Simko et al. 2018; Fontes et al. 2019a). Informações sobre o comportamento de acessos de *Lactuca* em bioensaios de inoculação natural/mecânica são escassos nas condições tropicais, sendo alguns dos esforços nessa área conduzidos por Nagai (1989), Guimarães et al. (2009) e Fontes et al. (2019a).

No ensaio de campo os acessos ‘UC02206’, ‘UC02203’, ‘Salinas 88’, ‘Belíssimo’, ‘Autumn Gold’, ‘R32’, ‘Bedford’, ‘Colorado’, ‘UC12103’, ‘UC12100’, ‘Ithaca’, ‘Dandie’, ‘Classic’ e ‘UC12101’ apresentaram níveis de incidência da doença abaixo de 20%. Valores semelhantes foram encontrados por Guimarães et al. (2009) avaliando progênies F5 do cruzamento entre ‘Brasil 303’ e a fonte de resistência ‘PI 342444’, com médias gerais de incidência da doença variando entre 19 e 29,75%. No entanto, estas análises foram conduzidas exclusivamente em sistemas de avaliação visual de sintomas e nenhuma avaliação utilizando antissoros específicos ou métodos moleculares. No presente trabalho, as amostragens de tecidos foliares sintomáticos realizadas também empregando testes sorológicos dot-ELISA, refina a estimativa de incidência da doença nas plantas no experimento de campo.

O acesso 'PI 342444' foi avaliado no presente estudo e se mostrou suscetível a GRSV. Essa fonte de resistência foi identificada com uma das mais promissoras quando avaliada em condições de campo aberto com inóculo natural na região Sudeste do Brasil (Nagai 1989; Guimarães et al. 2009). No entanto, informações não estão disponíveis com relação aos membros do gênero *Orthospovirus* contra as quais esse acesso foi desafiado nos ensaios. No presente estudo, os testes sorológicos também possibilitaram identificar GRSV como sendo o patógeno prevalente nessas condições de campo, um resultado de certa forma esperado devido a prevalência dessa espécie viral em regiões produtoras de alface do Brasil Central (Lima et al. 2016, Martinez et al. 2019). Diferentes hipóteses têm sido propostas visando explicar a predominância do GRSV em diferentes cultivos hortícolas, incluindo a prevalência do vetor *F. schultzei* nas regiões produtoras que, ainda não confirmado, pode possuir maior competência na aquisição e transmissão de GRSV em comparação com outros orthospovirus (Nagata et al. 2004; Martinez et al. 2019).

Ensaio de campo apresentam uma série de fatores impeditivos na seleção de acessos vegetais resistentes aos orthospovirus devido à natureza estocástica da distribuição do vetor/vírus na área, sendo indicada a conclusão de ensaios de seleção ('screening') em casa de vegetação com inoculação controlada. No entanto, ensaios de campo podem contribuir indicando genótipos suscetíveis de maneira precoce, bem como potenciais fontes de resistência putativa (Simko et al. 2018). Neste contexto, um subgrupo de acessos de *Lactuca* que apresentou os menores níveis de incidência em condições de campo foram desafiados com um número maior de isolados via ensaios de inoculação mecânica. Foram observados níveis mais elevados de incidência nos bioensaios com inoculação mecânica quando comparados ao experimento de campo, exceto para o isolado TSWV20. Resultado similar foi encontrado por Simko et al. (2018) que inocularam diferentes acessos de espécies de *Lactuca* com INSV. A infecção sob condições

naturais de inoculação pode ocorrer em momentos inadequados para o desenvolvimento do inseto e/ou vírus, culminando em menores incidências. Durante a condução dos nossos bioensaios em condição de casa de vegetação, picos de temperatura acima de 40 °C foram mensurados. É reconhecida a correlação entre longos períodos de exposição a temperaturas elevadas e ineficácia, atenuação ou mesmo supressão da resposta de defesa de plantas contra agentes virais. Um exemplo é o gene *Tsw* que possui resposta de hipersensibilidade a infecção de TSWV em plantas de *C. chinense* ‘PI 159236’, mas que apresenta termo-instabilidade em temperaturas acima de 32°C, permitindo incremento no número de plantas com sintomas sistêmicos (Moury et al. 1998).

O agrupamento formado pelos acessos de *L. sativa* ‘Bedford’, ‘Belíssimo’ e ‘UC12101’ apresentou os menores índices de incidência quando comparados aos demais acessos. Informações acerca do ‘background’ genético podem auxiliar na interpretação de respostas de resistência. No entanto, informações muito restritas estão disponíveis sobre a origem genética dos acessos ‘Bedford’ e ‘Belíssimo’. Por sua vez, as informações da origem do acesso *L. sativa* ‘UC12101’ são mais detalhadas, correspondendo a uma linhagem BC<sub>7</sub>S<sub>2</sub> obtida de um cruzamento do parental silvestre *L. saligna* ‘CGN5318’, com o objetivo de introgridir um segmento genômico contendo fatores de resistência para o míldio (*Bremia lactucae*). Informações sobre o comportamento desse acesso quando desafiado por orthospovirus não eram previamente conhecidas.

Na cultura da alface, estratégias baseadas na introgressão de fatores de resistência de cultivares silvestres é comum, o que pode haver mobilizado, via ‘linkage drag’, genes individuais ou grupos de genes de resistência efetivos contra orthospovirus eventualmente presentes nos ‘clusters’ contendo fatores de resistência contra *B. lactucae*. De fato, grupos de gene de

resistência estão distribuídos pelo genoma da alface em distintos ‘clusters’ (Meyers et al. 1998; Christopoulou et al. 2016). Sucessos na identificação e mobilização de fatores de resistência de germoplasma de espécies silvestres para acessos cultivados de *L. sativa* têm sido relatados para inúmeros patossistemas, incluindo patógenos virais (Cho et al. 1996; Lebeda et al. 2009; Silko et al. 2018) a INSV e TSWV (Cho et al. 1996; Silko et al. 2018). Desta forma, com os resultados obtidos, os acessos ‘UC12101’, ‘Bedford’ e ‘Belíssimo’ podem ser considerados potenciais parentais para serem incorporados ao programa de melhoramento de alface visando resistência contra isolados de GRSV e também TSWV. De acordo com o nosso conhecimento, este se constitui o primeiro relato formal de fontes de resistência e/ou tolerância em germoplasma de *Lactuca* contra isolados de GRSV a nível mundial. Estudos adicionais de herança e mapeamento genético serão importantes ações de pesquisa a fim de facilitar o monitoramento e a introgressão desse(s) fator(es) via seleção assistida por marcadores moleculares.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adkins S, Roskopf EN (2002). Key West nightshade, a new experimental host for plant viruses. **Plant Disease**, 86(12), 1310–1314.
- Appiah AS, Offei SK, Tegg RS, Wilson CR (2016). Varietal response to groundnut rosette disease and the first report of Groundnut ringspot virus in Ghana. **Plant Disease**, 100(5), 946–952.
- Boiteux LS (1995). Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. **Theoretical and Applied Genetics**, 90, 146–149.
- Boiteux LS, Giordano LB (1993). Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, 71(1-2), 151–154.
- Boiteux LS, de Avila AC (1994). Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense* ‘PI 159236’. **Euphytica**, 75(1-2), 139–142.
- Boiteux LS, Nagata T, Dutra WP, Fonseca MEN (1993). Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. **Euphytica**, 67(1-2), 89–94.
- Cho JJ, Custer DM, Brommonschenkel SH, Tanksley SD (1995). Conventional breeding: Host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to tomato spot wilt virus in vegetables. Tospoviruses and Thrips of Floral and Vegetable Crops, **Acta Horticulturae**, 431, 367–378.
- Christopoulou M, Wo SRC, Kozik A, McHale LK, Truco MJ, Wroblewski T, Michelmore RW (2015). Genome-wide architecture of disease resistance genes in lettuce. G3: **Genes, Genomes, Genetics**, 5(12), 2655–2669.
- Colariccio A, Eiras M, Chaves AL, Harakava, R, Chagas CM (2004). Tomato chlorotic spot virus in hydroponically-grown lettuce in São Paulo State, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 29, 307–311.
- Costa AS, Forster R (1941). Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus do “spotted wilt”. **Bragantia**, 1, 491–516.
- Da Silva, AR, Malafaia, G, Menezes, IPP (2017). Biotoools: An R function to predict spatial gene diversity via an individual-based approach. *Genetics and Molecular Research*, 16(2), 1–6.

- de Avila A, De Haan P, Kormelink R, Resende RDO, Goldbach RW, Peters D (1993). Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. **Journal of General Virology**, 74(2), 153–159.
- De Breuil S, Nievas MS, Giolitti FJ, Giorda LM, Lenardon SL (2008). Occurrence, prevalence, and distribution of viruses infecting peanut in Argentina. **Plant Disease**, 92(8), 1237–1240.
- De Maesschalck R, Jouan-Rimbaud D, Massart, DL (2000). The Mahalanobis distance. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 50(1), 1–18.
- Dianese EC, Fonseca MEN, Inoue-Nagata AK, Resende RO, Boiteux LS (2011). Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species. **Euphytica**, 180, 307–319.
- Ding M, Zhang LZ, Fang Q, Li T, Su T, X X (2004). Identification, purification and antiserum preparation of tospovirus isolate affecting potato. **Southwest China Journal of Agricultural Sciences**, 17, 160–162.
- Duarte LML, Rivas EB, Alexandre MAV, de Ávila AC, Nagata T, Chagas CM (1995). Chrysanthemum stem necrosis caused by a possible novel tospovirus. **Journal of Phytopathology**, 143(9), 569–571.
- Esquivel AF, Camelo-García VM, Rezende JAM, Kitajima EW, González LR, Sarubbi H (2019). First report of Groundnut ringspot tospovirus in Paraguay. **Australasian Plant Disease Notes**, 14 (1), 5.
- Fontes MG, Lima MF, Fonseca MEN, Boiteux LS (2018). First report of Groundnut ringspot orthotospovirus infecting field pea (*Pisum sativum* L.) crop in Brazil. **Plant Disease**, 102(2), 457.
- Fontes MG, Cabral CS, Lima MF, Fonseca MEN, Boiteux LS (2019a). Phenotypic expression and species-specific reaction of *Lactuca sativa* ‘PI 342444’ to groundnut ringspot virus (GRSV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates. **European Journal of Plant Pathology**, 155, 231–238.
- Fontes MG, Silva GFA, Lima MF, Fonseca MEN, Costa AF, Silva-Filho JG, Boiteux LS (2019b). First report of groundnut ringspot orthotospovirus infecting soybeans in Brazil. **Plant Disease**, 103(4), 777.

- Gracia O, De Borbon CM, De Millan NG, Cuesta GV (1999). Occurrence of different tospoviruses in vegetable crops in Argentina. **Journal of Phytopathology**, 147(4), 223–227.
- Guimarães AM, Pavan MA, Silva N (2009). Comportamento de progênies F5 de alface às tospoviroses em condições de campo. **Unimar Ciências**, 18, 37–40.
- He Z, Guo JF, Reitz SR, Lei ZR., Wu SY (2020). A global invasion by the thrip, *Frankliniella occidentalis*: Current virus vector status and its management. **Insect Science**, 27(4), 626–645.
- Jorge TS, Lima MF, Boiteux LS, Fonseca MEN, Kitajima EW (2021). First report of *Cichorium endivia* (Asteraceae) as a natural host of groundnut ringspot orthotospovirus in Brazil. **Plant Disease**, 105(3), 714.
- Jorge TS, Fontes MG, Lima MF, Boiteux LS, Fonseca MEN, Kitajima EW (2022). Natural Infection of *Cichorium intybus* (Asteraceae) by groundnut ringspot virus (Genus *Orthotospovirus*) isolates in Brazil. **Plant Disease**, 106(7), 2005.
- Jorge TS, Queiroz LN, Lima MF, Fonseca MEN, Fontes MG, Pereira-Carvalho RC, Kitajima EW, Aragão, FJL, Boiteux LS (2023). **Classical and biotechnological breeding of tomato, Capsicum, and lettuce for resistance to orthotospoviruses in Brazil**. In: Silva HR; Almeida LC, Rios JA, Michereff SJ. (Org.). Manejo de doenças de plantas: Controle genético, químico e biológico, nas perspectivas acadêmica e empresarial. 1ed. Recife-PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco, v. 1, p. 7–26.
- Kitajima EW (2020). An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926–2018). **Biota Neotropica**, 20 (2): e20190932.
- Kormelink R, Verchot J, Tao X, Desbiez C (2021). The Bunyavirales: The plant-infecting counterparts. **Viruses**, 13(5), 842.
- Lapointe FJ, Legendre P (1995). Comparison tests for dendrograms: A comparative evaluation. **Journal of Classification**, 12, 265–282.
- Lebeda A, Doležalová I, Křístková E, Kitner M, Petrželová I, Mieslerová B, Novotná A (2009). Wild *Lactuca* germplasm for lettuce breeding: Current status, gaps and challenges. **Euphytica**, 170, 15–34.
- Lima MF, Michereff-Filho M, Boiteux LS, Suinaga FA (2016). Doença vira-cabeça em alface: Sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle. **Embrapa: Circular Técnica Número 153**, 16 pp.

Martínez RT, Almeida MM, Rodriguez R, Cayetano X, Oliveira AS, Silva JM, Resende RO (2019). Analyses of orthotospovirus populations and dispersion under different environmental conditions in Brazil and in the Dominican Republic. **Tropical Plant Pathology**, 44, 511–518.

Meyers BC, Chin DB, Shen KA, Sivaramakrishnan S, Lavelle DO, Zhang Z, Michelmore RW (1998). The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. **The Plant Cell**, 10(11), 1817–1832.

Nagata T, Almeida ACL, Resende RDO, de Ávila AC (2004). The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, 53(2), 136–140.

Nagata T, Resende RDO, Kitajima EW, Costa H, Inoue-Nagata AK, de Ávila AC (1998). First report of natural occurrence of zucchini lethal chlorosis tospovirus on cucumber and chrysanthemum stem necrosis tospovirus on tomato in Brazil. **Plant Disease**, 82(12), 1403–1403.

O'Malley PJ, Hartmann RW (1989). Resistance to tomato spotted wilt virus in lettuce. **HortScience**, 24(2), 360–362.

Pietersen G, Morris J (2002). Natural occurrence of Groundnut ringspot virus on soybean in South Africa. **Plant Disease**, 86(11), 1271.

Pozzer L, Bezerra IC, Kormelink R, Prins M, Peters D, Resende RDO, De Ávila AC (1999). Characterization of a tospovirus isolate of Iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. **Plant Disease**, 83(4), 345–350.

R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rotenberg D, Whitfield AE (2018). Molecular interactions between tospoviruses and thrips vectors. **Current Opinion in Virology**, 33, 191–197.

Rybicki EP (2015). A Top ten list for economically important plant viruses. **Archives of Virology** 160 (1), 17–20.

Saraçlı S, Doğan N, Doğan İ (2013). Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. **Journal of Inequalities and Applications**, 2013: 203.

Schliep KP (2011). phangorn: Phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, 27(4) 592-593

Simko I, Richardson CE, Wintermantel W (2018). Variation within *Lactuca* spp. for resistance to Impatiens necrotic spot virus. **Plant Disease**, 102 (2), 341–348.

Webster, CG, de Jensen CE, Rivera-Vargas LI, Rodrigues JCV, Mercado W, Frantz G, Mellinger HC, and Adkins, S. 2013. First report of Tomato chlorotic spot virus (TCSV) in tomato, pepper, and jimsonweed in Puerto Rico. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2013-0812-01-BR

Webster CG, Frantz G, Reitz SR, Funderburk JE, Mellinger HC, McAvoy E, Turechek WW, Marshall SH, Tantiwanich Y, McGrath MT, Daughtrey ML, Adkins S (2015). Emergence of Groundnut ringspot virus and Tomato chlorotic spot virus in vegetables in Florida and the Southeastern United States. **Phytopathology** 105(3), 388–398.

Webster CG, Perry KL, Lu X, Horsman L, Frantz G, Mellinger C, Adkins S (2010). First report of Groundnut ringspot virus infecting tomato in south Florida. **Plant Health Progress**, 11(1), 49.

Webster CG, Perry KL, Lu XY, Horsman L, Frantz G, Mellinger C, Adkins S (2010). First report of Groundnut ringspot virus infecting tomato in south Florida. **Plant Health Progress**, 11(1), 49.

Webster CG, Reitz SR, Perry KL, Adkins S (2011). A natural M RNA reassortant arising from two species of plant-and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. **Virology**, 413(2), 216–225.

Webster CG, Turechek WW, Mellinger HC, Frantz G, Roe N, Yonce H, Vallad GE, Adkins S (2011). Expansion of Groundnut ringspot virus host and geographic ranges in solanaceous vegetables in peninsular Florida. **Plant Health Progress**, 12(1), 34.

Yu G, Smith D, Zhu H, Guan Y, Tsan-Yuk Lam T (2017). ggtree: An R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. **Methods in Ecology and Evolution**, 8(1), 28–36.

Zhang Z, Zheng K, Zhao L, Su X, Zheng X, Wang T (2021). Occurrence, distribution, evolutionary relationships, epidemiology, and management of orthotospoviruses in China. **Frontiers in Microbiology**, 12, 686025.

**Tabela 1.** Acessos de alface (*Lactuca* spp.) pertencentes ao Banco ativo de germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças utilizados no experimento de campo sob condições de inoculo natural de groundnut rinspot orthotospovirus (GRSV).

Acesso	Pais de origem	Morfotipo	Pedigree
<b>Amplus (CGN05163)</b>	Holanda	Lisa	<i>L. sativa</i> ‘Amplus’
<b>Argeles</b>	França	Lisa	<i>L. serriola</i> PIVT1168 (CGN10886)
<b>Autumn Gold</b>	USA	Crespa	<i>L. sativa</i> , ‘Empire’ × ‘Vanguard 75’
<b>Balesta</b>	USA	Indefinido	ND*
<b>Bedford</b>	USA	Crespa	ND
<b>Belissimo</b>	USA	Roxa crespa	ND
<b>Blonde (CGN04605)</b>	França	Lisa	ND
<b>Bourguignonne</b>	França	Lisa	<i>L. sativa</i> , ‘Bourguignonne G. B. d’Hiver’
<b>Caipira</b>	Brasil	Crespa/Mimosa	ND
<b>Capitan (CGN05140)</b>	França	Lisa	<i>L. serriola</i> PI 273596
<b>CGDM16</b>	Rep. Tcheca	Indefinido	<i>L. serriola</i> LSE/18 CGN11402
<b>Classic</b>	USA	Crespa	ND
<b>Cobham</b>	França	Lisa	ND
<b>Colorado (CGN24778)</b>	Holanda	Roxa crespa	<i>L. serriola</i> LS17
<b>Dandie (CGN05813)</b>	UK	Lisa	<i>L. sativa</i> , ‘Gotte à F. G. Noire’
<b>Discovery (RZ42-53)</b>	Holanda	Lisa	<i>L. saligna</i> ‘PIVT 1306’ (CGN05315)
<b>Femke</b>	USA	Lisa	ND
<b>Flash</b>	USA	Ornamental	ND
<b>Galega de Inverno</b>	Brasil	Romaine	ND
<b>Grand Rapids</b>	USA	Iceberg	ND
<b>Green Towers</b>	USA	Romana	ND
<b>Hilde II (CGN04623)</b>	Holanda	Lisa	<i>L. sativa</i> ‘British Hilde’ (CGN04623)
<b>Ithaca (PI 536843)</b>	USA	Iceberg	ND
<b>Joker</b>	USA	Ornamental	ND
<b>La Brillante</b>	França	Batavia	<i>L. sativa</i> CGN05170
<b>Lendinick</b>	USA	Indefinido	<i>L. sativa</i> CGN04529
<b>Libusa (RZ43-80)</b>	USA	Lisa	<i>L. serriola</i> × <i>L. sativa</i>
<b>Little Gem</b>	França	Indefinido	ND
<b>LS102 (CGN24780)</b>	USA	Silvestre	<i>L. serriola</i>
<b>Mariska (CGN10966)</b>	Holanda	Lisa	ND
<b>Ninja (CGN20716)</b>	Holanda	Lisa	<i>L. saligna</i>
<b>NUMDM15</b>	USA	Iceberg	<i>L. serriola</i> CGN05099
<b>NUMDM17</b>	USA	Iceberg	<i>L. serriola</i> LS102 CGN24780
<b>Patriot</b>	USA	Crespa	ND
<b>Pavane (CGN14609)</b>	Holanda	Romana	ND
<b>Penlake</b>	USA	Iceberg	<i>L. sativa</i> CGN11440
<b>PI 142871</b>	Iran	Romana	ND
<b>R32 (UC9602)</b>	USA	Crespa	<i>L. saligna</i> LJ81632
<b>R4T57D (CGN11403)</b>	UK	Lisa	<i>L. sativa</i> ‘Amplus’

<b>Regina</b>	Brasil	Lisa	ND
<b>RYZ2164</b>	USA	Indefinido	<i>L. serriola</i> CGN14255
<b>RYZ910457</b>	USA	Indefinido	ND
<b>Sabine (CGN09380)</b>	Holanda	Lisa	<i>L. serriola</i> PI 91532
<b>Salinas 88</b>	USA	Crespa	ND
<b>UC02202</b>	USA	Iceberg	<i>L. saligna</i> LJ85314
<b>UC02203</b>	USA	Iceberg	ND
<b>UC02204</b>	USA	Iceberg	<i>L. virosa</i> LJ85289
<b>UC02205</b>	USA	Iceberg	<i>L. serriola</i> W66336A
<b>UC02206</b>	USA	Iceberg	<i>L. serriola</i> W66331A
<b>UC07105</b>	USA	Iceberg	<i>L. sativa</i> PI 491226
<b>UC07106</b>	USA	Iceberg	<i>L. serriola</i> PI 491108
<b>UC07107</b>	USA	Iceberg	<i>L. saligna</i> PI 491206
<b>UC07108</b>	USA	Iceberg	<i>L. saligna</i> PI 491208
<b>UC12100</b>	USA	Iceberg	<i>L. saligna</i> CGN9311
<b>UC12101</b>	USA	Iceberg	<i>L. saligna</i> CGN5318
<b>UC12102</b>	USA	Iceberg	<i>L. saligna</i> CGN5282
<b>UC12103</b>	USA	Iceberg	<i>L. saligna</i> CGN5147
<b>UC12104</b>	USA	Iceberg	<i>L. saligna</i> UC04US2509
<b>UCDM10 (CGN11339)</b>	USA	Latin	<i>L. sativa</i> , 'Sucrine' (CGN04858 or 'Little Gem')
<b>UCDM14 (CGN11340)</b>	USA	Lisa	<i>L. sativa</i> , 'Gelber Winterkönig'
<b>UCDM2 (CGN11338)</b>	USA	Lisa	<i>L. sativa</i> , 'Meikoningen'/ 'May Queen'
<b>Valmaine (CGN05249)</b>	USA	Romaine	<i>L. serriola</i> PI 167150 & <i>L. serriola</i> PI 104584
<b>Vanda</b>	Brasil	Crespa	ND
<b>Vanguard (CGN05253)</b>	USA	Crespa	ND
<b>Vanguard 75</b>	USA	Crespa	ND

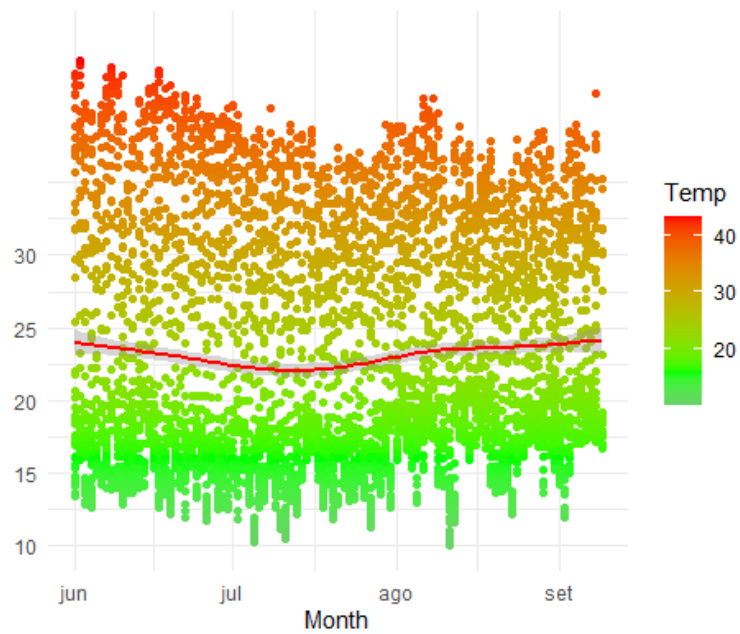
---

\*ND= Informacao não disponível.

**Tabela 2.** Lista de isolados caracterizados de groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) e tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV) utilizados nos experimentos de casa de vegetação e inoculação mecânica.

<b>Código do isolado e espécie viral</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>Origem geográfica do isolado</b>	<b>Hospedeira original</b>
<b>GRSV 04</b>	2016	Samambaia (DF, Brasil)	<i>Lactuca sativa</i> L.
<b>GRSV 11</b>	2016	Samambaia (DF, Brasil)	<i>Lactuca sativa</i> L.
<b>GRSV 28</b>	2022	Pires do Rio (GO, Brasil)	<i>Lactuca sativa</i> L.
<b>TSWV 13</b>	2022	Ceilândia (DF, Brasil)	<i>Solanum tuberosum</i> L.
<b>TSWV 20</b>	2022	Ceilândia (DF, Brasil)	<i>Solanum tuberosum</i> L.

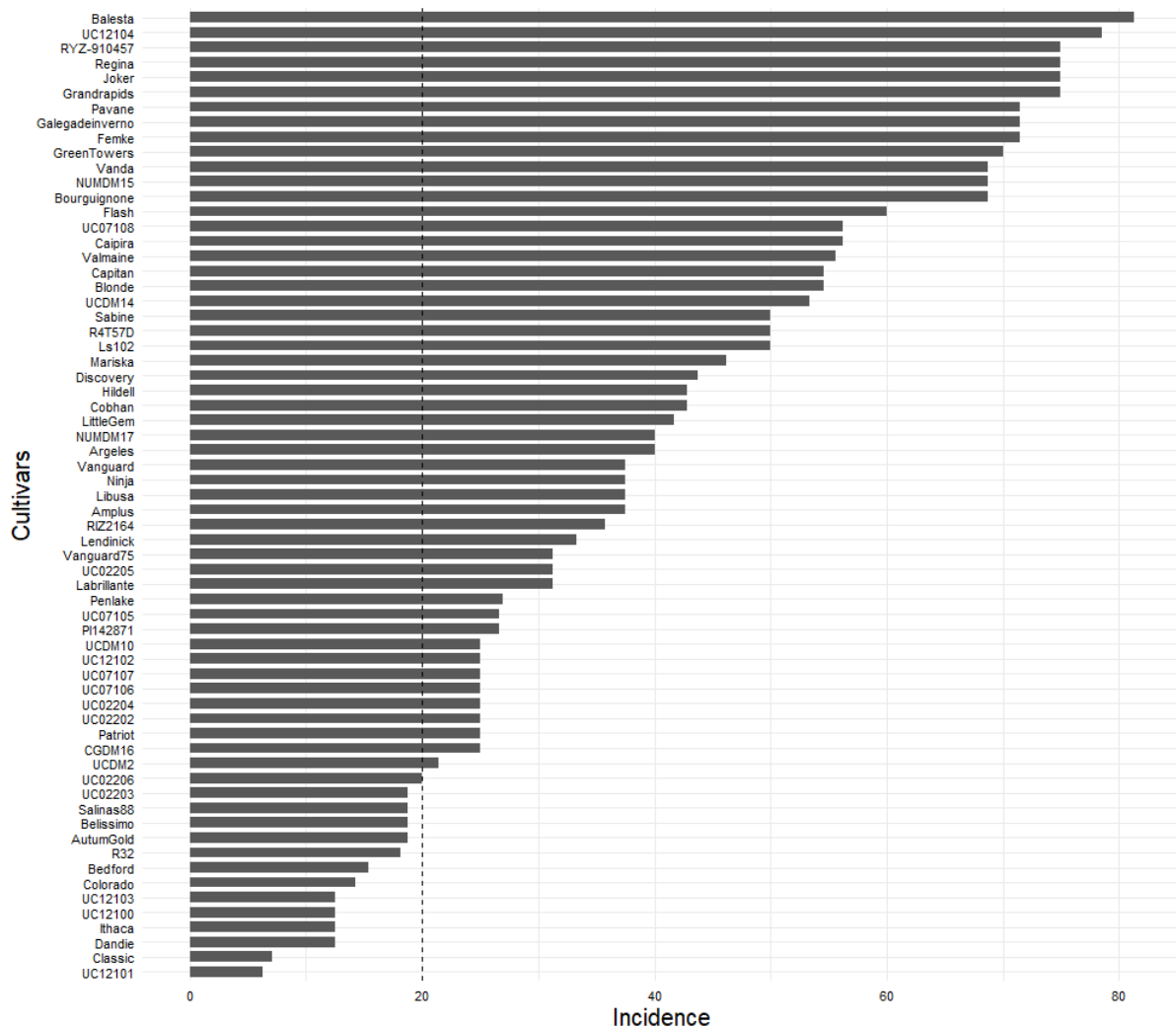




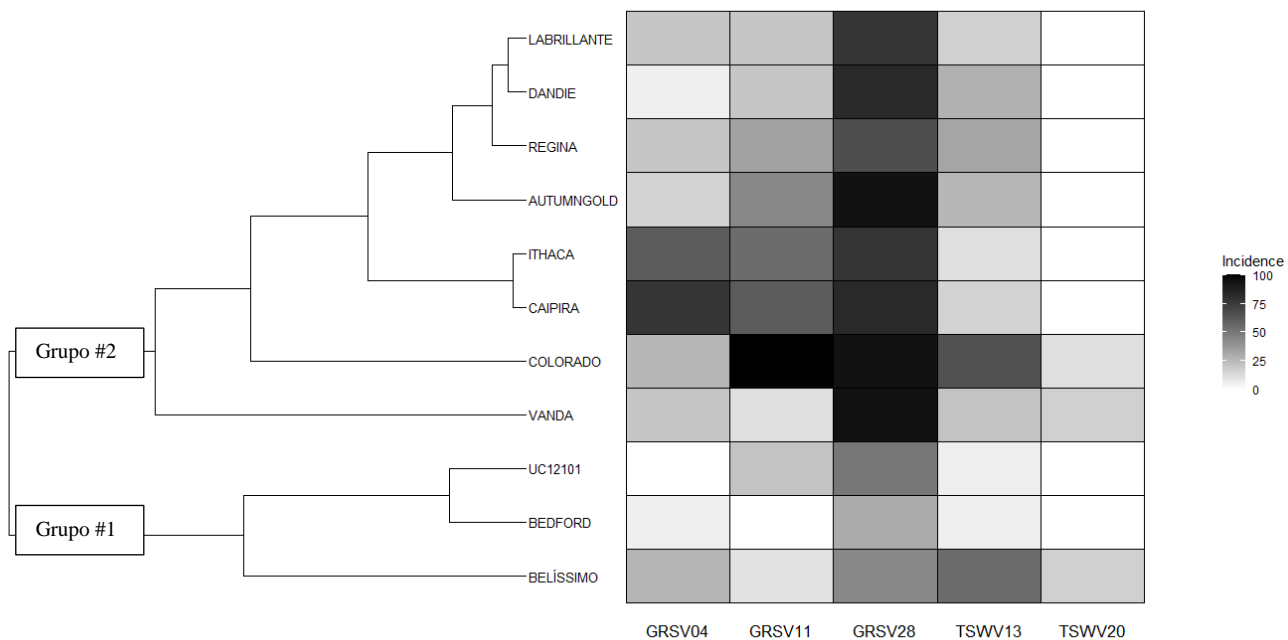
**Figura 1.** Temperatura média obtida pelo data logger HOBO U12-011 durante a condução dos experimentos de inoculação mecânica em condições de casa de vegetação com 11 acessos de de *Lactuca sativa*. A linha de tendência vermelha indica a temperatura média de um dia.



**Figura 2.** Aspecto do ensaio de campo conduzido para avaliação de germoplasma de *Lactuca* para exposição natural ao groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV). O ensaio foi posicionado na circunvizinhança de um campo de tomateiro severamente afetado por sintomas de infecção por orthotospovirus.



**Figura 3.** Incidência geral dos acessos de alface pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças utilizados no experimento de campo sob condições de inoculo natural de groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV). A linha tracejada demonstra o ponto de corte para a seleção dos acessos com incidência baixo de 20 %.



**Figura 4.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA utilizando a distância de Mahalanobis da porcentagem de incidência de 11 acessos de alface em relação aos isolados GRSV04, GRSV11, GRSV28, TSWV13 e TSWV20. O ponto de corte foi estimado pelo teste de Mojena com  $k=1.25$ , estabelecendo dois grupos sendo: **(Grupo #1)** Composto pelos acessos com maiores níveis de tolerância – ‘Bedford’, ‘Belíssimo’ e ‘UC1210’ e **(Grupo #2)** Composto por todos os demais oito acessos de *Lactuca sativa*.

## **CAPÍTULO 4**

**DINÂMICA DA REPLICAÇÃO VIRAL AVALIADA VIA qPCR E  
ANÁLISE TRANSCRITÔMICA DA INTERAÇÃO COMPATÍVEL  
ENTRE GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV)  
E *Lactuca sativa* ‘SALINAS’**

**Dinâmica da replicação viral avaliada via qPCR e análise transcritômica da interação compatível entre groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) e *Lactuca sativa* ‘Salinas’**

**Tiago Silva Jorge<sup>1</sup>; Mirtes Freitas Lima<sup>2</sup>; Leonardo Silva Boiteux<sup>1,2</sup> & Maria Esther de Noronha Fonseca<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>University of Brasilia (UnB), Institute of Biological Sciences, 70910-900, Brasília-DF, Brazil.

<sup>2</sup>Embrapa Vegetable Crops (Embrapa Hortaliças), National Center for Vegetable Crops Research (CNPV), 70275-970, Brasília-DF, Brazil.



## RESUMO

As espécies de *Orthospovirus* estão entre os principais patógenos da alface (*Lactuca sativa* L.) no mundo. No entanto, estudos de expressão gênica via RNA-seq são restritos a poucos patossistemas na cultura da alface, não sendo relatados até o momento para membros do gênero *Orthospovirus*. No presente trabalho foi conduzida uma análise transcritômica da interação compatível entre a cultivar suscetível ‘Salinas’ e um isolado de *Orthospovirus arachianuli* (GRSV), visando catalogar o repertório de genes diferencialmente expressos (DEGs). O momento ótimo para a confecção das bibliotecas de transcritos foi determinado através da quantificação absoluta do título viral via reação de qPCR com um sistema baseado em sondas fluorescentes. O experimento indicou 48 horas após a inoculação como o ponto de início do incremento do título viral ( $\approx 800$  mil cópias por amostra). Foram obtidas seis bibliotecas de transcritos, correspondendo a três triplicatas biológicas de cada grupo: plantas inoculadas com GRSV e plantas mock-inoculadas. A catalogação dos DEGs foi conduzida após a montagem utilizando o genoma de referência da cultivar ‘Salinas’ (versão 11) considerando-se um *fold change*  $\geq 1.5$  e *p-value*  $\leq 0,05$ . Um total de 272 genes diferencialmente expressos foram catalogados, totalizando 162 genes positivamente regulados e 110 genes negativamente regulados pelo processo de infecção viral. A análise funcional de um subgrupo de 20 genes com maiores níveis de expressão positiva e negativa demonstrou que todos estavam envolvidos em processos biológicos, funções moleculares e em componentes celulares relacionados a respostas de defesa e reconhecimento de fitopatógenos. O GRSV é um parasita molecular obrigatório que mobiliza funções da célula vegetal para sua replicação e tradução de suas proteínas. Para isso suprime as respostas de defesa da planta e induz uma série de mudanças bioquímicas que resultam na expressão dos sintomas. Os genes condicionantes da infecção por GRSV (= genes de suscetibilidade viral ou genes S) detectados no presente trabalho, são de interesse para o melhoramento biotecnológico da alface, podendo representar potenciais alvos de silenciamento para a obtenção de cultivares com níveis mais elevados de resistência a este patógeno.

## ABSTRACT

*Orthospovirus* species are among the main pathogens of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in the world. However, gene expression studies via RNA-seq are restricted to a few pathosystems in lettuce, not being reported so far for members of the genus *Orthospovirus*. In the present work, a transcriptomic analysis of the compatible interaction between the susceptible cultivar ‘Salinas’ and a *Orthospovirus arachianuli* (GRSV) isolate was conducted, aiming to catalog the repertoire of differentially expressed genes. The optimal moment for making the transcript libraries was determined by absolute quantification of the viral titer via qPCR reaction with a system based on fluorescent probes. The experiment indicated 48 hours after inoculation as the starting point of the viral titer increment ( $\approx 800$  thousand copies per sample). Six libraries of transcripts were obtained, corresponding to three biological triplicates of each group: plants inoculated with GRSV and mock-inoculated plants. The cataloging of the DEGs was carried out after assembly using the reference genome of the cultivar ‘Salinas’ (version 11) considering a fold change  $\geq 1.5$  and p-value  $\leq 0.05$ . A total of 272 DEGs were cataloged, totaling 162 genes positively regulated and 110 genes negatively regulated by the viral infection process. The functional analysis of a subgroup of 20 genes with higher levels of positive and negative expression showed that all of them were involved in biological processes, molecular functions, and cellular components related to defense responses and recognition of phytopathogens. GRSV is an obligate molecular parasite that mobilizes plant cell functions for its replication and protein translation, suppressing the defense responses of the host plant and induces a series of biochemical changes that result in the expression of symptoms. The genes conditioning GRSV infection (= viral susceptibility genes or S genes) detected in the present work are of biotechnological lettuce breeding interest and may represent potential targets for silencing aiming to develop cultivars with higher levels of resistance to this pathogen.



## INTRODUÇÃO

Plantas são organismos autotróficos e sésseis que acumulam uma vasta quantidade de nutrientes essenciais, podendo servir como potenciais fontes de exploração por uma ampla gama de agentes fitopatogênicos. Para sua proteção, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa caracterizado por duas ‘camadas’ de resposta (em pré-infecção e em pós-infecção) que mobilizam diferentes componentes anatômicos, genéticos, histológicos e bioquímicos (Miller et al., 2017; Souza & Carvalho, 2019). Como mecanismos que conferem estas barreiras antimicrobianas, cada célula da hospedeira possui receptores intercelulares e intracelulares, detectam os agentes patogênicos e desencadeiam/modulam as respostas de defesa local e sistêmica a partir do sítio de infecção (Miller et al., 2017).

Dentre os agentes fitopatogênicos, os vírus representam um dos principais grupos causadores de danos em culturas agrônomicas. Os vírus são parasitas intramoleculares obrigatórios da maquinaria celular, que, durante seu processo de estabelecimento, multiplicação e dispersão ocasionam/induzem uma série de alterações no metabolismo da planta hospedeira (Boualem et al., 2016). Com o avanço nas tecnologias de sequenciamento, os fatores modulados durante seu ciclo infeccioso de diferentes gêneros de vírus têm sido elucidados via estudos de expressão gênica (Bilgin et al., 2010, Nady et al., 2016, Cervera et al., 2018, Li et al., 2018).

Dentre os principais gêneros de fitovírus, os orthospovirus são reconhecidos como uma ameaça global para os cultivos agrícolas, ocasionando perdas em diversas plantas de importância econômica (Pappu et al., 2009, Oliver & Whitfield, 2014). Os orthospovirus são vírus de RNA fita simples senso negativo e ambisenso, tri-segmentados, transmitidos por espécies de tripes (ordem Thysanoptera). A partícula de orthospovirus apresenta uma

característica estrutural peculiar de ser envolta por glicoproteínas originárias do retículo endoplasmático da planta hospedeira. Estudos relacionados com a caracterização dos padrões de expressão gênica têm sido conduzidos em hospedeiras infectadas com membros das espécies *Orthospovirus tomatomaculae* (TSWV), *Orthospovirus tomatizonae* e *Orthospovirus impatiensnecromaculae* (INSV) em culturas como tomate, pimentão, tabaco e *Arabidopsis* (Catoni et al., 2009, Choi et al., 2015, Huang et al., 2017, Zheng et al., 2019). Estas análises têm indicado que a infecção por orthospovirus acarreta, principalmente, a diminuição da expressão de processos biológicos relacionados ao metabolismo primário e secundário, fotossíntese I e II, oxi-redução, cascata de proteínas quinases e diminuição nas rotas sinalizadoras dos hormônios ácido salicílico e ácido jasmônico, comprometendo assim o sistema de defesa da hospedeira (Catoni et al., 2009, Choi et al., 2015, Huang et al., 2017, Zheng et al., 2019).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil e no mundo, sendo afetada por diferentes membros do gênero *Orthospovirus* (Jorge et al. 2023). Embora seja uma cultura de importância econômica, estudos de expressão gênica via RNA-seq são restritos a poucos patossistemas, não sendo relatados até o momento para membros do gênero *Orthospovirus* (Cremer et al., 2007, Stassen et al., 2012, Wibberg et al., 2014, Verwaaijen et al., 2017). As informações são ainda mais escassas para membros da espécie *Orthospovirus arachianuli* (GRSV), que é o patógeno viral de maior importância para o cultivo de alface na América Latina (Lima et al. 2016; Martinez et al. 2019). Informações acerca da resistência genética a orthospovirose em alface são limitadas, sendo relatadas apenas contra isolados TSWV e INSV (O'Malley & Hartmann, 1989; Cho et al., 1996; Simko et al. 2018; Simko et al. 2023). Fontes et al. (2019) demonstrou que acessos do 'PI 342444' (padrão resistente contra TSWV) e 'Vanda' (padrão suscetível), apresentaram níveis elevados de incidência quando

desafiadas com isolados de GRSV, sendo relatada a resistência do tipo espécie-específica ao TSWV. Desta forma, nenhum acesso de alface descrito na literatura até o momento foi relatado possuindo níveis elevados de resistência a membros da espécie GRSV.

Genes condicionantes da infecção por fitopatógenos são denominados genes de suscetibilidade viral (genes S). Tais genes podem promover a suscetibilidade ou compatibilidade via três mecanismos básicos, sendo: 1- Compatibilidade básica, que auxilia no reconhecimento e penetração da hospedeira; 2- Compatibilidade sustentada, responsável pela proliferação e disseminação na hospedeira; 3- Regulação negativa da sinalização de imunidade (Van Schie & Takken, 2014).

Quando a perda da compatibilidade representa um custo adaptativo ao vírus, a mutação de um ou mais fatores de suscetibilidade por tecnologias como como Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9) podem contribuir para a obtenção de plantas com resistência duradoura e eficaz contra um ou mais grupos de vírus, já sendo comprovada para vírus de RNA e DNA (Zaidi et al., 2018.). Um exemplo foi a modificação de poucos nucleotídeos na região terminal N' e C' do gene *eIF4E* via CRISPR/Cas9. Essa mutação foi capaz de produzir progênies de pepino (*Cucumis sativus* L) resistentes a membros do gênero *Potyvirus* e imunes a membros do gênero *Ipomovirus* (Chandrasekaran et al. 2016). Diante o exposto, no presente trabalho foi conduzida uma análise transcritômica da interação compatível entre a cultivar suscetível de alface 'Salinas' e um isolado de GRSV, visando catalogar o repertório de genes diferencialmente expressos (DEGs) com o objetivo de futuro uso em estratégias de silenciamento desses genes.

## MATERIAL & MÉTODOS

**Local de realização dos experimentos de Real-time PCR (qPCR) e bioensaios** – Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e nos laboratórios de Virologia, Análise Genômica e Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças em Brasília-DF. Os experimentos de qPCR foram estabelecidos visando atender todas as diretrizes indicadas pelo *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments* (MIQE), visando a acurácia, repetibilidade e qualidade dos dados obtidos em estudos de expressão gênica (Bustin et al., 2009). A cultivar de alface ‘Salinas’ foi selecionada por ser suscetível a diferentes membros do gênero *Orthotospovirus* (incluindo GRSV) e por representar o genoma completo de referência e disponível no NCBI, na versão Lsat\_Salinas\_V11 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_002870075.4/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_002870075.4/)).

Foram selecionados, inicialmente, cinco períodos após a inoculação para a montagem dos bioensaios, sendo os tempos de 1 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias após a inoculação, delineados com base na dinâmica de surgimento de sintomas em alface e informações acerca de estudos transcritoama contra orthotospovirus na cultura do tomateiro. Um experimento de qPCR foi conduzido para determinação da dinâmica da replicação viral com base nos tempos amostrados, selecionando-se o tempo de 48 horas para a condução do RNAseq e posterior análise de genes diferencialmente expressos em uma interação compatível.

**Caracterização e preparo do inóculo para os bioensaios** – Foram realizados testes de patogenicidade e agressividade para selecionar os isolados com maior competência no desenvolvimento de sintomas. Os isolados foram caracterizados biologicamente em plantas indicadoras e molecularmente via RT-PCR utilizando um set de primers previamente

sintetizados (Eiras et al., 2001), desenhados para identificação da proteína N (segmento S) com capacidade para discriminação de todos os membros do gênero *Orthospovirus* que acometem a cultura da alface no Brasil BR60 (5'-AGA GCA ATC GTG TCA-3') e BR65 (5'-ATC AAG CCT TCT GAA AGT CAT-3'). O sequenciamento Sanger e análises das sequências parciais foram realizadas no laboratório de Análise Genômica da Embrapa, escolhendo-se o isolado GRSV 1A, oriundo de uma planta alface com sintomas severos. A multiplicação do inóculo foi realizada inoculando-se plantas de *Datura stramonium*, com aproximadamente 10 dias após seu transplante. A inoculação foi realizada topicamente, com auxílio do abrasivo carborundum e tampão fosfato e sulfato de sódio 0.1% (P/V) 0.01M pH 7.4. O período adequado para a utilização do inóculo é a partir do surgimento de sintomas na região apical, com folhas retorcidas e pontuações cloróticas (**Figura 1**). Todo o inóculo produzido no experimento foi obtido apenas pela primeira passagem do inóculo original de alface para plantas de *D. stramonium*, visando diminuir o acúmulo de mutações defectivas (*defective interfering RNA*), comuns após multiplicações sucessivas dos orthospovirus, que contribuem para um menor sucesso da infecção (Resende et al. 1992; Inoue-Nagata et al. 1997).

**Preparo de mudas, montagem dos bioensaios e amostragem para transcrito** – Sementes da cultivar 'Salinas' foram distribuídas em bandejas de isopor contendo substrato comercial Basaplant e adubo de dissociação lenta Osmocote® (15N-9P-12K). Para a quebra de dormência característica da alface e homogeneização de germinação, as bandejas foram acondicionadas em ambiente escuro de câmara fria a 8 °C por 48 horas. Após a germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de 300 mL contendo solo autoclavado, sendo inoculadas após a emissão do primeiro par de folhas verdadeiras (**Figura 2**).

**Análise transcritômica** – Para o experimento de transcritoma, as plantas foram divididas em cinco sets com base na dinâmica de surgimento de sintomas do patossistema *x* alface, e em trabalhos prévios de transcritoma em outras culturas como tomate e pimentão (Fontes et al. 2017). Os períodos selecionados foram de 1 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias após a inoculação. Cada set foi composto por três réplicas biológicas de 15 plantas cada (45 plantas no total), três plantas mock-inoculadas (controle negativo da inoculação) e plantas de *D. stramonium* (controle positivo). A inoculação das plantas de alface foi realizada por intermédio de inoculação mecânica após a emissão do primeiro par de folhas, com auxílio do abrasivo carborundum e tampão fosfato e sulfato de sódio 1% (P/V) 0.01M pH 7.4. Após o processo de inoculação, as folhas foram lavadas em água corrente para remoção do excesso de abrasivo carborundum. Após a inoculação, as amostras foram coletadas em seus respectivos períodos, sendo acondicionada uma folha em microtubos 1,5 mL individualizados, resfriados previamente/posteriormente em nitrogênio líquido. Apenas uma folha foi coletada para permitir o pleno desenvolvimento das plantas/vírus, que foram utilizadas para a confirmação da infecção através de avaliação visual e teste sorológico dot-ELISA.

**Avaliação visual e sorológica via dot-ELISA e confirmação da infecção por um isolado de GRSV** – Visando garantir que as amostras empregadas no estudo de transcritoma e determinação da dinâmica de replicação viral fossem oriundas de plantas comprovadamente infectadas, três semanas após a inoculação inicial, amostras individualizadas de todas as plantas de alfaces inoculadas foram submetidas a avaliação de sintomas visuais e detecção de antígeno via sorologia. Amostras foliares foram coletadas em sacos plásticos e armazenadas em isopor com gelo para posterior realização do teste sorológico dot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA), seguindo a metodologia descrita por Almeida et al. 1995. O antissoro empregado foi produzido Laboratório de Virologia Vegetal e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças,

sendo específico para a proteína do nucleocapsídeo (proteína N) de GRSV. Com os dados obtidos, foram mensuradas a porcentagem de plantas positivas pelo teste sorológica, comparando-se com os dados de avaliação visual (**Figura 3**).

**Extração de RNA total de plantas sintomáticas e positivas no teste dot-ELISA** – Devido à baixa quantia de tecido vegetal disponível, diferentes métodos de extração de RNA total foram avaliados no presente experimento, sendo selecionado a extração por intermédio do kit do ReliaPrep RNA Miniprep Systems (Promega). As amostras (50 mg) foram retiradas do freezer e imediatamente acondicionadas em tubos contendo seis *beads* e 600  $\mu\text{L}$  do buffer LBA + 1-thioglycerol, sendo posteriormente acondicionadas em isopor com gelo. As amostras foram homogeneizadas no aparelho Precellys por duas vezes, por um período de 30 segundos, sendo acondicionadas em isopor com gelo entre os intervalos de homogeneização. Posteriormente, 500  $\mu\text{L}$  do homogeneizado foram transferidos para novos tubos, e submetidos a uma centrifugação de 1min a 14.000 rpm. Após isso, o sobrenadante foi recuperado e transferido para novos tubos, sendo adicionada uma proporção de 60% de álcool isopropanol. As amostras foram agitadas em vórtex durante cinco segundos, sendo transferidos 500uL do homogeneizado para tubos de coleta contendo as colunas. Uma centrifugação inicial de 30 segundos a 14.000 rpm foi conduzida, descartando-se o tubo de coleta e inserido a coluna em um novo tubo. Posteriormente, foi realizada a primeira lavagem com 500  $\mu\text{L}$  tampão RNA Wash Solution (RWA). Após a primeira lavagem, foi preparado uma solução contendo 24  $\mu\text{L}$  do Yellow Core Buffer, 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnCl}_2$  e 3  $\mu\text{L}$  da enzima DNase I 0.09 M 3  $\mu\text{L}$  para cada amostra. Aplicou-se 30  $\mu\text{L}$  desta solução por um período de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente. Após isso, a coluna foi lavada com 200  $\mu\text{L}$  da solução Column Wash Solution (CWE) e submetida por 15 segundos de centrifugação a 14.000 rpm. Posteriormente, a membrana foi lavada duas vezes com a solução RWA, adicionando-se 500  $\mu\text{L}$  e 300  $\mu\text{L}$  por 30 segundos / 14.000 rpm e

2min/14.000rpm, respectivamente. Ao final da centrifugação, a amostra foi aliquotada em tubos de 30 µL (um para os experimentos de ‘time-course’ e um para o transcrito), e uma última alíquota de 10 µL para mensuração da qualidade e quantidade do DNA extraído em espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, USA).

**Determinação do período ótimo para a confecção do transcrito via qPCR** – A determinação do momento ótimo utilizados na confecção das bibliotecas de transcritos foi realizada através da quantificação absoluta do título viral nos diferentes momentos após inoculação, via reação de qPCR com um sistema baseado em sondas fluorescentes. A primeira etapa realizada foi a obtenção do cDNA a partir das amostras de RNA total, com auxílio do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). O RNA total foi inicialmente diluído para a concentração de 50 ng/ µL. O Master Mix empregado na construção do cDNA foi obtido utilizando-se 2.0 µL do 10x RT Buffer, 0.8 µL 25X dNTP mix (100mM), 2.0 µL de 10x RT Random Primers, 1.0 µL da enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4.2 µL de água Nuclease-free, totalizando um volume de reação de 10 µL por amostra. Posteriormente, a síntese do cDNA foi realizada empregando-se 10 µL do MasterMix e 10 µL do RNA total. As condições de amplificação utilizadas foram um ciclo inicial de 10 minutos a 25 °C, seguido por um ciclo de 120 minutos a 37°C, e um último ciclo de 5 minutos a 85 °C. A eficiência da síntese do cDNA foi mensurada através da amplificação via PCR de dois pares de primers barcoding, sendo matK472F (5’–CCC RTY CAT CTG GAA ATC TTG GTT C–3’) e matK1248R (5’–GCT RTR ATA ATG AGA AAG ATTTCT GC–3’) e psab\_part2 (PsaB766L (5’–AGA CCC TTA TGY CCA CGY C–3’) e PsaB1526R (5’–GCT TGG CAA GGA AAT TTT GA–3’) (Yu et al. 2011). As condições de PCR empregadas foram um ciclo inicial de 95 °C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 48 °C, 1 minuto a 72 °C e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. O perfil de amplicons obtidos foram revelados



em gel de agarose 1.5% (**Figura 4**). Após a confirmação da eficiência na síntese do cDNA, foi realizada a quantificação absoluta do título viral via reação de qPCR no equipamento QuantStudio® 6 Flex System (Thermo Fisher), calibrado previamente para a detecção do agente fluorescente FAM. As reações foram conduzidas com três réplicas biológicas por períodos após infecção (1 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias) e três triplicatas técnicas para cada réplica biológica. Por se tratar de um experimento de quantificação absoluta, uma curva padrão foi elaborada a partir da diluição seriada 1:10 ( $10^{10}$  a  $10^1$  cópias) de um fragmento de DNA gBLOCK (IDT). A tecnologia do fragmento gBlock é baseada na obtenção de um fragmento quimérico, contendo a sequência parcial da proteína N do GRSV. As sequências da proteína N e sonda utilizadas no presente estudo foram baseadas num ensaio prévio desenvolvido para a detecção de GRSV via qPCR com sondas fluorescentes (GRSV Forward 5'–GAG ACT TGC TAT AAT GCT TGG AGG TA–3', GRSV-reverse 5'–GGC AAG AAC AAC ACT GAT CAT C–3', e GRSV-sonda 5'–ATC CCT CTC ATT GCT TCT GTT GAC AGC TTC–3') (Leão et al., 2016). As reações de qPCR foram realizadas com o auxílio do kit PrimeTime qPCR Probe Assays (IDT). A primeira etapa realizada foi a adição da referência passiva (ROX) ao Master Mix, sendo seguida a proporção indicada pela fabricante. Posteriormente, as reações foram conduzidas utilizando-se 5.0 µL do Master Mix, 0.5 µL do par de primers (10 µM), 2.0 µL da sonda marcada com agente fluorescente FAM (1 µM) e 2.0 µL de cDNA, totalizando um volume final de 10 µL por reação. As condições de amplificação da reação foram: 95 °C por 3 minutos para ativação da enzima, seguido 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos, e 60 °C por 30 segundos. Após a análise, obtivemos os resultados do perfil de amplificação (**Figura 5**), o comportamento e adequação da curva padrão (**Figura 6**) e o total de partículas das amostras em cada momento de coleta réplica biológica, bem como a média de partículas de cada período (**Figura 7**).

**Construção das bibliotecas de transcritos** – Alíquotas de RNA total extraídas de amostras do período de 48 horas após a inoculação (três réplicas biológicas de plantas inoculadas + três réplicas biológicas mock-inoculadas) foram encaminhadas para a empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba–SP) em caixa de isopor contendo gelo seco. Todas as etapas relacionadas ao preparo de amostras para a etapa de obtenção de bibliotecas e de sequenciamento e foram realizadas pela empresa. A plataforma de sequenciamento empregada foi o *Illumina HiSeq 2500*, pares ends, optando-se por mapear 20 milhões de *reads* em cada réplica biológica.

**Análise de bioinformática dos dados de RNAseq: Alinhamento com genoma de referência e anotação manual** – Após a obtenção das bibliotecas de transcritos do período de 48 horas, foram realizadas as análises de bioinformática utilizando para a montagem do transcrito Lasergene Seqman NGene e para análise ArrayStar (Lasergene – Madison WI) no laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. No software SeqMan NGene, os procedimentos de análise de qualidade das sequências, ‘trimagem’ de adaptadores utilizados pela plataforma de sequenciamento, e o alinhamento com o genoma de referência da cultivar ‘Salinas’ foram realizados automaticamente, seguindo as configurações padrões do programa. As sequências foram mapeadas com a última versão do genoma de referência de alface disponível no NCBI ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_002870075.4/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_002870075.4/)). As sequências mapeadas (*reads*) foram empregadas para a avaliação da expressão gênica diferencial, utilizando o software ArrayStar. Os *reads* foram normalizados utilizando a análise estatística DEseq2, seguindo o método descrito em Love et al. (2014). A identificação de genes com expressão diferencial foi conduzida através da execução de testes t, nos quais foi integrado o controle de FDR (False Discovery Rates), para a correção adequada dos níveis de significância (Benjamini & Hochberg, 1995). Os genes considerados diferencialmente

expressos foram aqueles que apresentaram uma variação de expressão (*fold change*) superior a 1.5 entre as amostras, apresentando um valor de significância (*p-value*) igual ou inferior a 0,05%. As anotações dos genes foram realizadas pelo software SeqMan Pro, através de algoritmos padrões do programa (Gnomom). Posteriormente, a análise funcional dos genes foi realizada manualmente utilizando a base de dados UniProt, pertencente ao UniProt consortium (<https://www.uniprot.org>).

## RESULTADOS

**Dinâmica da replicação viral e seleção do período para a análise transcritômica** – A eficiência da síntese de cDNA foi aferida a partir da observação do perfil de amplicons obtidos na reação de RT-PCR com o par de primers matK e psaB\_part2. Todas as amostras empregadas no experimento obtiveram sucesso na amplificação e visualização de bandas, demonstrando que a síntese do cDNA ocorreu adequadamente (**Figura 4**).

A partir da confirmação da qualidade do cDNA, foi realizada a quantificação absoluta do título viral, utilizando a curva padrão a partir de diluições seriadas do fragmento gBLOCK. O perfil de amplificação permitiu observar que o sistema desenvolvido para a determinação do título viral absoluto via qPCR obteve sucesso na amplificação e detecção do título viral de GRSV em amostras da cultivar ‘Salinas’. Os valores obtidos de Cycle threshold (CT) variaram dentre uma média de 23, 23, 26, 21 e 15 ciclos, respectivamente para os períodos de coleta 1 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias. Os valores de CT observados na curva padrão variaram entre uma média 6,8 ciclos a 34 ciclos, de acordo com o grau de diluição seriada (**Figura 5**).

A curva padrão apresentou uma inclinação de -3.187 e um coeficiente de correlação entre os pontos e amostras de  $R^2$ : 0.989. A efetividade da reação foi de aproximadamente 106%. A partir

dos resultados obtidos, foi possível observar que as amostras avaliadas no experimento se adequaram a curva padrão, com um título viral variando entre  $10^6$  e  $10^3$  partículas (**Figura 6**).

De posse dos resultados da curva padrão e perfil de amplificação (**Figura 5** e **Figura 6**) foram estabelecidos o número total de partículas de GRSV entre os períodos após inoculação avaliados. Houve variação no número de partículas dentre e entre os períodos de inoculação avaliados, sendo observada uma tendência de queda do título viral entre os períodos de 1 hora ( $\approx$  230 mil cópias), 6 horas ( $\approx$  170 mil cópias) e 24 horas ( $\approx$  50 mil cópias). No entanto, a partir de 48 horas ( $\approx$  800 mil cópias) ocorreu um incremento significativo no título viral até o período de 7 dias (aproximadamente 50 milhões de cópias). Os resultados obtidos permitiram subdividir a resposta ao GRSV em eventos iniciais de infecção viral (1 hora e 6 horas), interação vírus x planta sem a presença de sintomas (24 horas e 48 horas) e interação vírus x planta com o desenvolvimento inicial de sintomas (7 dias). O período selecionado para a confecção das bibliotecas de transcritos foi o tempo de 48 horas. Para facilitar a avaliação visual, a escala utilizada para a construção do gráfico foi transformada para valores de  $\log(x)$  (**Figura 7**).

**Mapeamento de reads e análise de genes diferencialmente expressos na interação compatível entre GRSV e a cultivar ‘Salinas’** – Foram obtidas seis bibliotecas de transcritos, correspondendo a três triplicatas biológicas de plantas inoculadas após 48 horas (48 horas R1, 48 horas R2, 48 horas R3) e plantas mock-inoculadas após 48 horas (48 horas Mock R1, 48 horas Mock R2, 48 horas Mock R3). O total de reads mapeados com o auxílio do genoma de referência de alface ‘Salinas’ v.11 está apresentado na **Tabela 1**. A catalogação dos DEGs foi conduzida considerando-se um *fold change*  $\geq 1.5$  e *p-value*  $\leq 0,05$ , e visualizada via gráfico *Scatter plot* (**Figura 8**). Um total de 272 diferencialmente expressos foram catalogados e observados através da análise de gráfico *Scatter plot*, totalizando-se 162 genes positivamente

regulados pelo processo de infecção viral (**Figura 9**) e 110 genes negativamente regulados (**Figura 10**).

A análise funcional dos DEGs negativamente regulados foi dividida entre processos biológicos, componente celular e função molecular. Os resultados obtidos de DEGs relacionados a processos biológicos demonstraram que a maioria dos *reads* mapeados possuíam papel na resposta de defesa, geração de metabólitos precursores e energia, processos biológicos, fotossíntese, regulação da transcrição de DNA, organização da parede celular, morfogênese da estrutura anatômica, organização da parede celular, via de sinalização ativada por auxina, via de sinalização ativada por ácido abscísico e proteólise. Quanto aos componentes biológicos, os DEGs foram anotados em sua maioria no núcleo, membrana celular, cloroplasto, região extracelular, membrana plasmática, citoplasma, tilacoide, estrutura de encapsulamento externo, apoplasto, citosol e vacúolo. Referente a função molecular, os DEGs foram classificados em sua maioria em atividade de fator de transcrição de ligação ao DNA, função molecular, ligação, ligação da região regulada de transcrição cis, ligação de íon metálico, ligação de íon de zinco, ligação de DNA, ligação de ATP, atividade de dimerização de proteínas, ligação de ácido abscísico e atividade inibidora da proteína fosfatase (**Figura 11**).

Quanto a análise funcional dos DEGs positivamente regulados, a categoria de processos biológicos foi representada majoritariamente por processos de resposta de defesa e reconhecimento de fitopatógenos, organização da parede celular, transporte de lipídios, e proteólise e resposta ao ácido abscísico. Na categoria de componentes celulares os principais DEGs foram relacionadas a membrana plasmática, região extracelular, citosol, núcleo, cloroplasto, plasmodesma e apoplasto. No que se refere a categoria de função molecular, as principais funções obtidas foram relacionadas a ligação a íon metálico, ligação a ATP, atividade

oxidoreductase, ligação a lipídio, ligação ao grupo heme, atividade de quinase de proteína serina/treonina, ligação a íon de cobre, atividade de quinase de proteína serina, atividade de fator de transcrição de ligação a DNA, atividade de hidrólise de ATP e ligação a íon de ferro (**Figura 12**). A análise funcional dos 20 genes com maiores níveis de expressão positiva e negativa demonstrou que todos estavam envolvidos em processos biológicos, funções moleculares e em componentes celulares relacionados a diferentes atividades que, dentre as de maiores interesse, possuem papel em respostas de defesa e reconhecimento de fitopatógenos (**Tabela 2**).

## DISCUSSÃO

A determinação do título viral absoluto via qPCR com o auxílio de sondas fluorescentes apresentou-se como uma estratégia viável no reconhecimento da dinâmica da replicação em diferentes períodos após inoculação de plantas da cultivar ‘Salinas’ e o isolado GRSV 1A. O título viral apresentou variação dentre e entre os períodos após inoculação avaliados (**Figura 7**). Inicialmente, o título viral apresentou um padrão de queda entre os períodos iniciais de 1 hora, 6 horas e 24 horas após inoculação. A média de partículas virais detectadas entre os períodos de 1 hora e 6 horas foram semelhantes, sendo observado uma pequena diminuição na média de partículas detectadas. Estes valores semelhantes devem-se, provavelmente, a detecção do inóculo utilizado no processo de inoculação mecânica, mesmo sendo realizada uma lavagem na superfície foliar após a inoculação. No entanto, entre as amostras coletadas no período de 6h, foi observada uma variação no título viral dentre as triplicatas biológicas, com o número de partículas variando entre 10 mil e 250 mil partículas virais. Essa variação observada no título viral não era esperada, devido a comprovação da presença do vírus via análise dot-ELISA e avaliação visual dos sintomas. No entanto, um possível erro amostral pode ter acontecido devido a distribuição desigual das partículas virais dentro do tecido vegetal durante o processo de infecção e movimento dentro da planta, ocasionando um processo de subamostragem. Um

estudo sobre a distribuição desigual no gênero *Orthospovirus* já foi observado para membros da espécie *Orthospovirus iridimaculaflavi*, acometendo plantas de cebola (Bag et. 2015). Outros resultados indicam que o decaimento do título viral é um processo esperado em experimentos com distribuição tópica do inóculo, sendo constatado que o incremento no conteúdo total de RNA de células epidérmicas de *Nicotiana tabacum* ocorreu somente após sete horas da inoculação (Fry & Matthwes, 1963). Por fim, o maior título viral foi encontrado nas triplicatas biológicas do tempo de 7 dias, sendo o período cujo tecidos vegetais apresentam sintomas iniciais de deformação e pontuações cloróticas, com título viral de aproximadamente 50 milhões de cópias. A seleção do período de coleta 48 horas então se mostrou efetiva para a construção das bibliotecas objetivando-se a descrição dos eventos iniciais de resposta de defesa da planta, onde visamos o reconhecimento genes de suscetibilidade viral durante o período latente.

Os vírus são parasitas obrigatórios que requerem as funções da célula vegetal para sua replicação e tradução de suas proteínas. Para isso suprimem as respostas de defesa da planta e induzem uma série de mudanças bioquímicas que resultam na expressão dos sintomas. Muitos dos genes com expressão alterada encontrados nesse transcrito codificam proteínas que possuem funções enzimáticas ou estruturais ligadas a alterações no balanço osmótico via mudanças na parede celular (LOC111921764, LOC111899681, LOC111915172, LOC111881608, LOC111899681, LOC111888215, LOC111916523 ), transporte de íons e lipídeos (LOC111915890, LOC111915891, LOC128125933, LOC128134124, LOC111915889, LOC111897966, LOC111884131, LOC111889610) e hidrolise de açúcares (LOC111877668, LOC111905063, LOC111912031). A dinâmica ‘source/sink’, bem como os componentes integrais do ciclo de vida nas plantas, também podem ser afetados durante a infecção por patógenos. Sabendo que as citocininas estão envolvidas na dinâmica ‘source/sink’

durante o desenvolvimento da planta, os açúcares solúveis têm sido implicados na defesa da planta contra patógenos fúngicos (Miller, 2017).

As expansinas listadas são relacionadas com a supressão da resposta de defesa induzida por proteínas do tipo NB-LRR. A participação das expansinas em respostas a infecção viral já foram descritas para alguns patossistemas, estando associadas modificação da estrutura da parede, participando no fenótipo da resposta de hipersensibilidade (Kozziel et al. 2021). Park et al. (2017) desenvolveram experimentos com membros da espécie *Turnip mosaic virus* (TuMV) e observaram NbEXPA1 (expansina) é recrutada para o complexo de replicação viral. O silenciamento deste gene resultou na inibição da infecção de TuMV, comprovando que a NbEXPA1 era um gene de suscetibilidade viral.

Genes que codificam proteínas com função enzimática de modificação ou degradação de outras proteínas como as chaperonas (LOC111900337), quinases (LOC111897164, LOC111892699, LOC111877045, LOC111878485), proteases (LOC111877039), methyltransferases (LOC111914969) também apresentaram expressões significativamente moduladas após infecção por GRSV em alface. Proteínas chaperonas podem interferir com movimento viral célula-a-célula como previamente demonstrado da ligação com a proteína NSm de orthotospovirus (Leastro et al. 2015). Esses genes também tiveram expressão modificada no transcrito de tomateiro após infecção por tomato spotted wilt orthotospovirus (Ordaz et al., 2023). Quinases representam um grupo de proteínas bastante abundante em interações incompatíveis em uma ampla gama de patossistemas incluindo os virais (Carmo et al., 2017; Tang et al., 2017; Zhang & Klessig, 2001). Essas proteínas estão envolvidas em cascatas de sinalização desencadeadas por PAMPs (Miller et al., 2017), podendo ser ativadas por vários



estresses abióticos, como lesão mecânica, alta salinidade e alta ou baixa osmolaridade, bem como por elicitores derivados de patógenos (Tang et al. 2017).

Os fitohormônios ácido jasmônico e etileno estão envolvidos nas respostas de defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos, incluindo infecção por patógenos necrotróficos e danos mecânicos. Genes que codificam proteínas responsivas a hormônios como etileno (LOC111885768) e auxina (LOC111877814) estão envolvidos na regulação da defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos, incluindo infecção por patógenos necrotróficos e danos mecânicos (Aerts et al., 2021). A regulação pode ocorrer na transcrição ou diretamente com interação com proteínas.

O gene LOC111897139) é um membro da “DEAD-box helicase superfamily”. Helicases de DNA e RNA tem papel importante em manter as funções celulares em condições de stress (Mohapatra et al. 2023). Por sua vez, LOC111888299 codifica uma proteína similar a Rbm24, que se liga a RNA e mantém a estabilidade de mRNAs e, desta forma, regula a expressão de genes específicos (Jiang et al., 2014). Em plantas, estes genes estão relacionados a resposta imune contra vírus (Lee et al., 2012). Durante a infecção viral esse gene foi negativamente regulado, o que pode descartar uma ação direta promovendo a estabilidade do RNA viral e indicar uma ação em proteínas da planta que promovam a ação do vírus e indução de sintomas.

Algumas classes de genes induzidos por stress biológico em geral são as fitoalexinas, fenilpropanoides, flavonoides, terpenoides, antocianinas e alcaloides. A acumulação destes compostos nos sítios de infecção são a chave para o início da resposta incompatível ou de hipersensibilidade (Pinheiro et al., 2022). O gene LOC111876156 é um membro da família “bHLH-MYC & R2R3-MYB transcription factors”, essa família gênica regula a síntese de fenilpropanoides em várias espécies de plantas (Cultrone et al., 2010). A inibição desse gene

foi observada na resposta da alface suscetível ‘Salinas’ a GRSV, assim como outros genes relacionados a defesa inicial a patógenos tais como LOC111905063 (Polyphenoloxidase).

O gene LOC11187766 codifica *beta-fructofuranosidase soluble isoenzyme I*, também denominada de Invertase, que são glicoproteínas que possuem papéis na degradação de carboidratos e resposta de patógenos. Segundo Kulshrestha et al. (2013), este grupo de proteínas tem papel em resposta de defesas a infecção viral, por intermédio da expressão de proteínas PR. Além das invertases as duas lectinas com expressão diferencial encontradas (LOC128127569 e LOC111890979) ligam-se a carboidratos e estão ligadas à sinalização na resposta a stress biótico (Miller et al., 2017).

O LOC111890979 corresponde a um gene que codifica uma lectina do tipo “horcolin”. Na interação GRSV – alface o LOC 111890979 foi regulado negativamente no transcrito. As lectinas do tipo “horcolin” têm papel importante porque podem ligar-se ao envelope glicoproteico de virus. Horcolin, por essa função, é considerada uma potente molécula antiviral (Narayanan et al., 2022).

PEPCK (LOC111900240) está frequentemente presente tecidos desafiados por patógenos. Em muitos desses tecidos, grandes quantidades de amônio provavelmente são produzidas pela fenilalanina amônia liase (PAL) durante a síntese de compostos fenólicos. Assim, a gliconeogênese poderia ser utilizada no metabolismo do malato liberado do vacúolo que está associado ao armazenamento/liberação vacuolar de amônio. Além disso, é possível que a gliconeogênese possa estar associada à osmorregulação. Assim, em tricomas e em alguns outros tecidos, tanto o malato quanto os açúcares podem ser usados para controlar processos como expansão e importação de materiais (Walker et al., 2021).

Em sumário, o resultado do transcrito forneceu um vasto painel de genes potencialmente regulados durante a interação de uma cultivar de alface suscetível e um isolado de GRSV. Experimentos com qPCR estão em andamento para comprovar essa expressão diferencial via comparação com genes de referência. A validação de genes de referência está em andamento. A identificação de cultivares tolerantes (ver **Capítulo 3**) permitirá também o contraste com a expressão em resposta incompatível.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, N; MENDES, MP; VAN WEES, SC. 2021. Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. **The Plant Journal**, 105(2), 489–504.

BAG, S; SCHWARTZ, HF; CRAMER, CS; HAVEY, MJ; PAPPU, HR. 2015. Iris yellow spot virus (Tospovirus: Bunyaviridae): From obscurity to research priority. **Molecular Plant Pathology**, 16(3), 224–237.

BENJAMINI, Y; HOCHBERG, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society Series 57**: 289–300.

BILGIN, DD; ZAVALA, JA; ZHU, JIN; CLOUGH, SJ; ORT, DR; DELUCIA, EH. 2010. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. **Plant, Cell & Environment**, 33(10): 1597–1613.

BOUALEM, A; DOGIMONT, C; BENDAHMAE, A. 2016. The battle for survival between viruses and their host plants. **Current Opinion in Virology** 17: 32–38.

BUSTIN, SA., BENES, V, GARSON, JA., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., WITTEWER, CT. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, 55 (4): 611–622.

CARMO, LS; MURAD, AM; RESENDE, RO; BOITEUX, LS; RIBEIRO, SG; JORRÍN-NOVO, JV; MEHTA, A. 2017. Plant responses to tomato chlorotic mottle virus: Proteomic view of the resistance mechanisms to a bipartite begomovirus in tomato. **Journal of Proteomics**, 151: 284–292.

CATONI, M; MIOZZI, L; FIORILLI, V; LANFRANCO, L; ACCOTTO, GP. 2009. Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by Tomato spotted wilt virus reveals organ-specific transcriptional responses. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 22: 1504–1513.

CERVERA, H; AMBRÓS, S; BERNET, GP; RODRIGO, G; ELENA, SF. 2018. Viral fitness correlates with the magnitude and direction of the perturbation induced in the host's transcriptome: The tobacco etch potyvirus—Tobacco case study. **Molecular Biology and Evolution**, 35(7): 1599–1615.

CHANDRASEKARAN, J; BRUMIN, M; WOLF, D; LEIBMAN, D; KLAP, C; PEARLSMAN, M; GAL-ON, A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. **Molecular Plant Pathology**, 17(7), 1140–1153.

CHOI, H; JO, Y; LIAN, S; JO, KM; CHU, H; YOON, JY; CHOI, S-K; KIM, K-H; CHO, WK. 2015. Comparative analysis of chrysanthemum transcriptome in response to three RNA viruses: Cucumber mosaic virus, Tomato spotted wilt virus and Potato virus X. **Plant Molecular Biology** 88: 233–248.

CREMER, K; MATHYS, J; VOS, C; FROENICKE, L; MICHELMORE, RW; CAMMUE, BPA; DE CONINCK, B. 2013. RNA seq-based transcriptome analysis of *Lactuca sativa* infected by the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. **Plant, Cell & Environment**, 36(11):1992–2007.

CULTRONE, A; COTRONEO, PS; REFORGIATO-RECUPERO, G. (2010). Cloning and molecular characterization of R2R3-MYB and bHLH-MYC transcription factors from *Citrus sinensis*. **Tree Genetics & Genomes**, 6(1), 101–112.

EIRAS, M; RESENDE, RO; MISSIAGGIA, AA; ÁVILA, AC. 2001. RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. **Fitopatologia Brasileira**, 26(2):170–175.

FONTES, MG; CABRAL, CS; LIMA, MF; FONSECA, MEN; BOITEUX, LS. 2019. Phenotypic expression and species-specific reaction of *Lactuca sativa* ‘PI 342444’ to groundnut ringspot virus (GRSV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates. **European Journal of Plant Pathology**, 155(1): 231–238.

FRY, PR; MATTHEWS, REF. 1963. Timing of some early events following inoculation with tobacco mosaic virus. **Virology**, 19(4): 461–469.

HUANG, C., CUN, Y., YU, H., TONG, Z., XIAO, B., SONG, Z., LIU, Y. 2017. Transcriptomic profile of tobacco in response to Tomato zongate spot orthotospovirus infection. **Virology Journal**, 14(1): 1–11.

INOUE-NAGATA, A. K., KORMELINK, R., NAGATA, T., KITAJIMA, E. W., GOLDBACH, R., PETERS, D. 1997. Effects of temperature and host on the generation of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs. **Phytopathology**, 87(11), 1168–1173.

JIANG Y, ZHANG M, QIAN Y, XU E, ZHANG J, CHEN X. 2014. Rbm24, an RNA-binding protein and a target of p53, regulates p21 expression via mRNA stability. **Journal of Biological Chemistry**, 289(6): 3164–3175.

LEÃO, EUA, SPADOTTI, DM., ROCHA, KCG., LIMA, EFB., TAVELLA, L, TURINA, M, KRAUSE-SAKATE, R. 2016. A TaqMan Real-Time RT-PCR assay for detection of groundnut ringspot virus. **Journal of Plant Pathology**, 98(2): 347–350.

LEASTRO MO, PALLAS V, RESENDE RO, SANCHEZ-NAVARRO JA. 2015. The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. **Virology**, 478: 39–49.

LEE, D. H., KIM, D. S., HWANG, B. K. 2012. The pepper RNA-binding protein CaRBP1 functions in hypersensitive cell death and defense signaling in the cytoplasm. **Plant Journal**, 72: 235–248.

LI, K, WU, G., LI, M., MA, M., DU, J., SUN, M. QING, L. 2018. Transcriptome analysis of *Nicotiana benthamiana* infected by Tobacco curly shoot virus. **Virology Journal**, 15(1): 1–15.

LIMA, M., MICHEREFF-FILHO, M., BOITEUX, L.S., SUINAGA, F. 2016. Doença vira-cabeça em alface: sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica Número 153**. 16p.

- LIMA, MF; BARRIOLLI, CC; FONTES, MG; BOITEUX, LS; ALMEIDA, JM. 2015. A five-year survey of tospoviruses infecting vegetable crops in main producing regions of Brazil. p. 117. In: Book of **Abstracts X<sup>th</sup> International Symposium on Thysanoptera & Tospoviruses**. Asilomar, Pacific Grove, CA: USDA-ARS. v. 1.
- LIVAK, KJ, SCHMITTGEN, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4): 402-408.
- LOVE, MI., HUBER, W, ANDERS, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, 15(12): 1-21.
- MILLER, R. N. G., COSTA ALVES, G. S., VAN SLUYS, M. A. (2017). Plant immunity: Unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. **Annals of Botany**, 119(5): 681-687.
- MOHAPATRA, MD, POOSAPATI, S., SAHOO, RK, SWAIN, DM. Helicase: A genetic tool for providing stress tolerance in plants. **Plant Stress**, 9: 2023.
- NAGY PD. 2016. Tombusvirus-host interactions: Co-opted evolutionarily conserved host factors take center court. **Annual Review of Virology** 3: 491-515.
- NARAYANAN V, BOBBILI KB, SIVAJI N, JAYAPRAKASH NG, SUGUNA K, SUROLIA A, SEKHAR A. 2022. Structure and Carbohydrate Recognition by the Nonmitogenic Lectin Horcolin. **Biochemistry**, 61(6): 464-478.
- O'MALLEY, PJ.; HARTMANN, RW. 1989 Resistance to tomato spotted wilt virus in lettuce. **HortScience**, 24: 360-362
- OLIVER, JE, WHITFIELD, AE. 2016. The genus Tospovirus: emerging bunyaviruses that threaten food security. **Annual Review of Virology**, 3:101-124.
- ORDAZ NA, NAGALAKSHMI U, BOITEUX LS, ATAMIAN HS, ULLMAN D, DINESH-KUMAR SP. 2023. The *Sw-5b* NLR immune receptor induces earlier transcriptional changes

in response to thrips and mechanical modes of inoculation of *Tomato spotted wilt orthotospovirus*. **Molecular Plant Microbe Interactions** (on-line) doi: 10.1094/MPMI-03-23-0032-R.

PAPPU HR, JONES RAC, JAIN RK. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research** 141: 219–236.

PINHEIRO, T.D.M.; REGO, E.C.S.; ALVES, G.S.C.; FONSECA, F.C.D.A.; COTTA, M.G.; ANTONINO, J.D.; GOMES, T.G.; AMORIM, E.P.; FERREIRA, C.F.; COSTA, M.M.D.C.; MILLER, R.W. 2022. Transcriptome profiling of the resistance response of *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 to *Pseudocercospora musae*. **International Journal of Molecular Sciences**, 23: 13589.

R CORE TEAM 2021. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RESENDE, R.R, DE HAAN, P., VAN DE VOSSSEN, E., DE ÁVILA, A. C., GOLDBACH, R., PETERS, D. (1992). Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. **Journal of General Virology**, 73(10): 2509–2516.

REYES-CHIN-WO, S, WANG, Z, YANG, X, KOZIK, A., ARIKIT, S, SONG, C, MICHELMORE, RW. 2017. Genome assembly with in vitro proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. **Nature Communications**, 8(1):1–11.

SCHUT, JW., THABUIS, APP, VILLEVIELLE, M 2014. Tomato spotted wilt virus and/or Impatiens necrotic spot virus resistance in cultivated lettuce. **World Intellectual Property Organization**, International Publication Number: WO 2014/140341 A1.

SOUZA, PFN, CARVALHO, FEL. 2019.. Killing two birds with one stone: how do plant viruses break down plant defenses and manipulate cellular processes to replicate themselves? **Journal of Plant Biology**, 62(3):170–180.



STASSEN, JH., SEIDL, MF., VERGEER, PW., NIJMAN, IJ., SNEL, B, CUPPEN, E, VAN DEN ACKERVEKEN, G. 2012. Effector identification in the lettuce downy mildew *Bremia lactucae* by massively parallel transcriptome sequencing. **Molecular Plant Pathology**, 13(7): 719–731.

TANG, D., WANG, G., ZHOU, J. M. 2017. Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. **The Plant Cell**, 29(4): 618–637.

VAN SCHIE CCN, TAKKEN FLW. 2014. Susceptibility genes 101: How to be a good host. **Annual Review of Phytopathology** 52: 551–581.

VERWAAIJEN, B, WIBBERG, D, KRÖBER, M, WINKLER, A, ZRENNER, R, BEDNARZ, H, SCHLÜTER, A. 2017. The *Rhizoctonia solani* AG1-IB (isolate 7/3/14) transcriptome during interaction with the host plant lettuce (*Lactuca sativa* L.). **PloS One**, 12(5): e0177278.

WALKER, R.P.; CHEN, Z.-H.; FAMIANI, F. **2021**. Gluconeogenesis in Plants: A Key Interface between Organic Acid/Amino Acid/Lipid and Sugar Metabolism. **Molecules**, 26: 5129.

WIBBERG, D, JELONEK, L, RUPP, O, KRÖBER, M, GOESMANN, A, GROSCH, R, SCHLÜTER, A. 2014. Transcriptome analysis of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IB 7/3/14 applying high-throughput sequencing of expressed sequence tags (ESTs). **Fungal Biology**, 118(9-10): 800–813.

YU, J., XUE, J. H., & ZHOU, S. L. (2011). New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution**, 49(3): 176–181.

ZAIDI, SSEA; MUKHTAR, M. S; MANSOOR, S. 2018. Genome editing: targeting susceptibility genes for plant disease resistance. **Trends in Biotechnology**, 36(9): 898–906.

ZHANG S, KLESSIG DF. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. **Trends in Plant Science**, 6: 520–527.

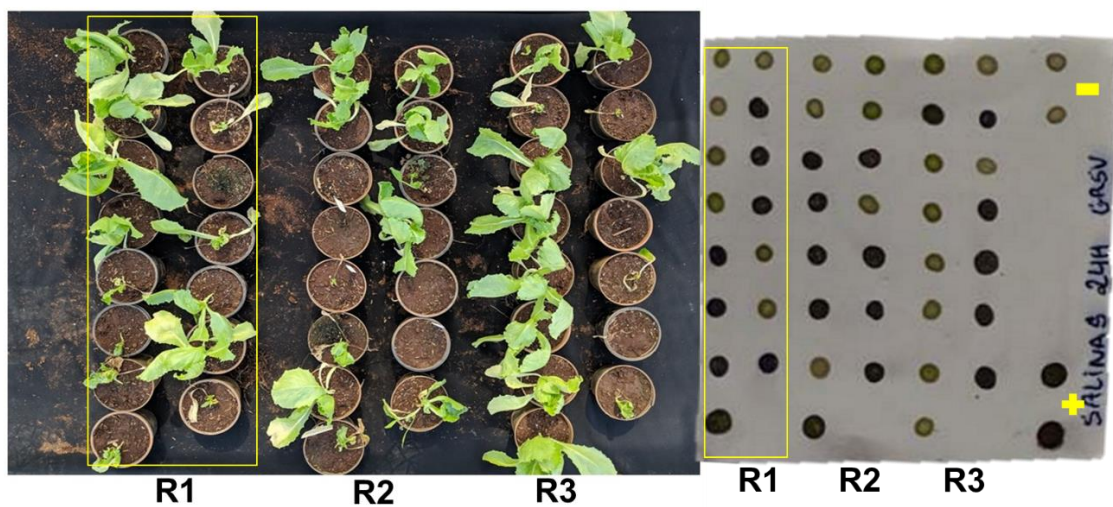
ZHENG, X., CHEN, Y., ZHAO, L., CHEN, Y., ZHENG, L., ZHENG, K., ZHANG, J. 2019. Tripartite interactions between jasmonic/salicylic acid pathways, western flower thrips, and thrips-transmitted tomato zonal necrotic spot virus infection in *Capsicum annuum*. **Arthropod-Plant Interactions**, 13(2): 289–297.



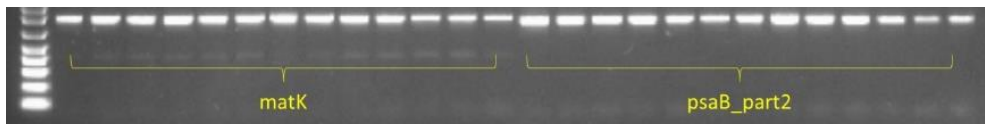
**Figura 1.** Planta de *Datura stramonium* utilizada na multiplicação do isolado groundnut ringspot orthospovirus GRSV 1A empregado nos bioensaios de transcrito. Os sintomas caracterizados em estágio inicial são a presença folhas retorcidas e pontuações cloróticas da região apical.



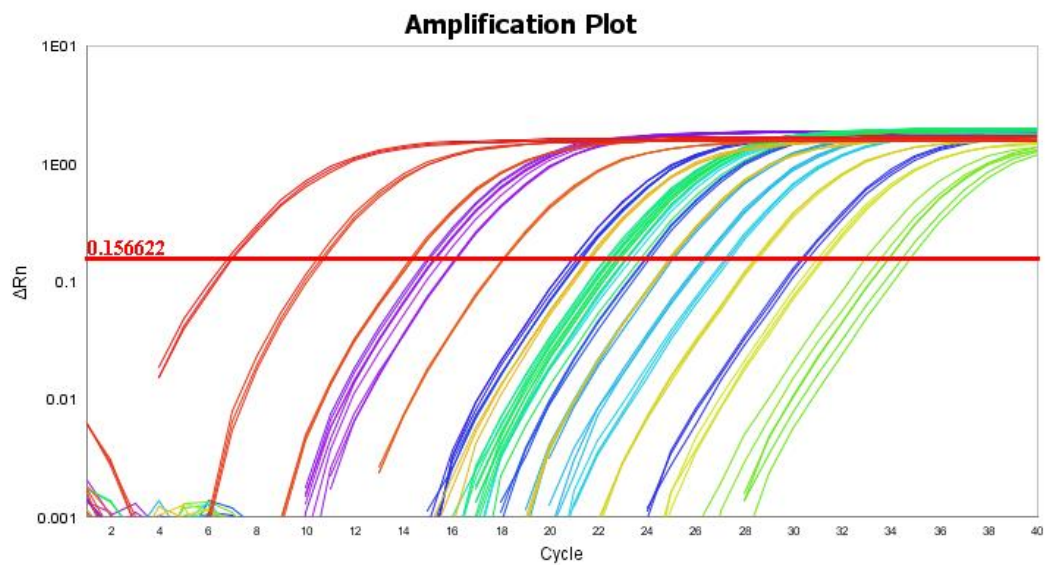
**Figura 2.** Planta de alface ‘Salinas’ após a emissão do primeiro par de folhas verdadeiras sendo utilizadas nos bioensaios envolvendo o estudo do transcrito da interação com um isolado groundnut ringspot orthotospovirus.



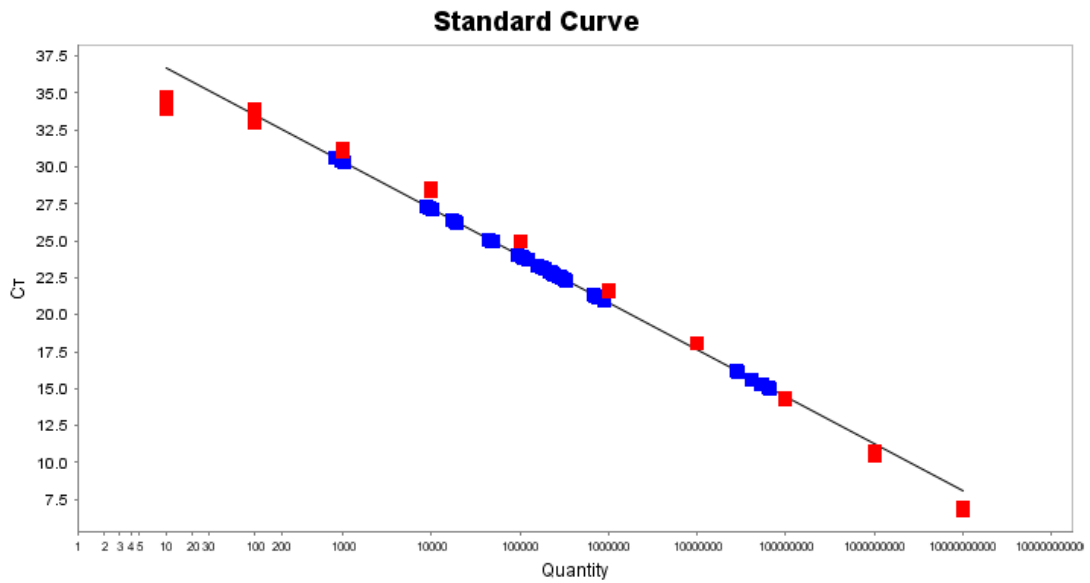
**Figura 3.** Painéis com os resultados obtidos no ensaio biológico. Barras retangulares demonstram a correspondência plantas sintomáticas/assintomáticas (painel esquerdo) e amostras positivas/negativas (painel direito). Painel esquerdo: Reação fenotípica de plantas de alface cultivar ‘Salinas’ inoculadas mecanicamente com o isolado groundnut ringspot orthotospovirus GRSV 1A. Painel direito: Resultado obtido na reação sorológica via teste dot-ELISA. Cada pontuação corresponde a uma amostra individual de alface. Pontos arroxeados representam a detecção do antígeno viral, enquanto pontos esverdeados demonstram plantas não infectadas.



**Figura 4.** Perfil de amplicons (aproximadamente 700 pares de base) dos genes de alface *matK* e *psaB* (controles da eficiência da síntese de cDNA) em relevados em gel de agarose (1,5%).

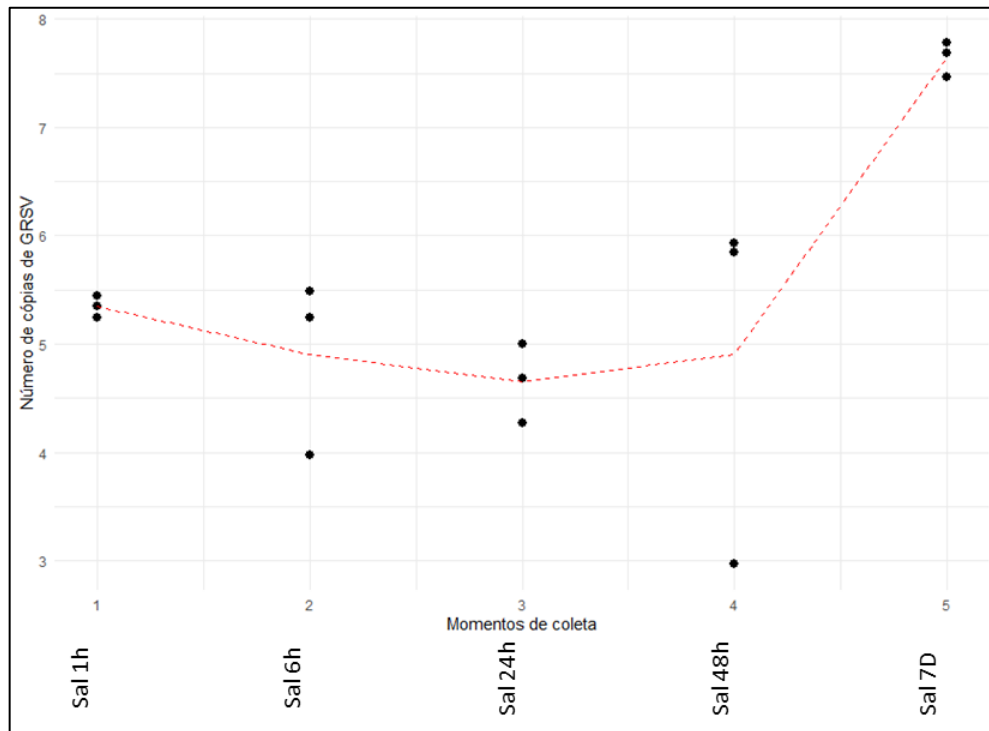


**Figura 5.** Perfil de amplificação mostrando a detecção de um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) em sistema de qPCR com sondas fluorescentes. O valor de *threshold* (0.156622) foi determinado automaticamente pelo software QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.7.2 (Thermo Fisher).

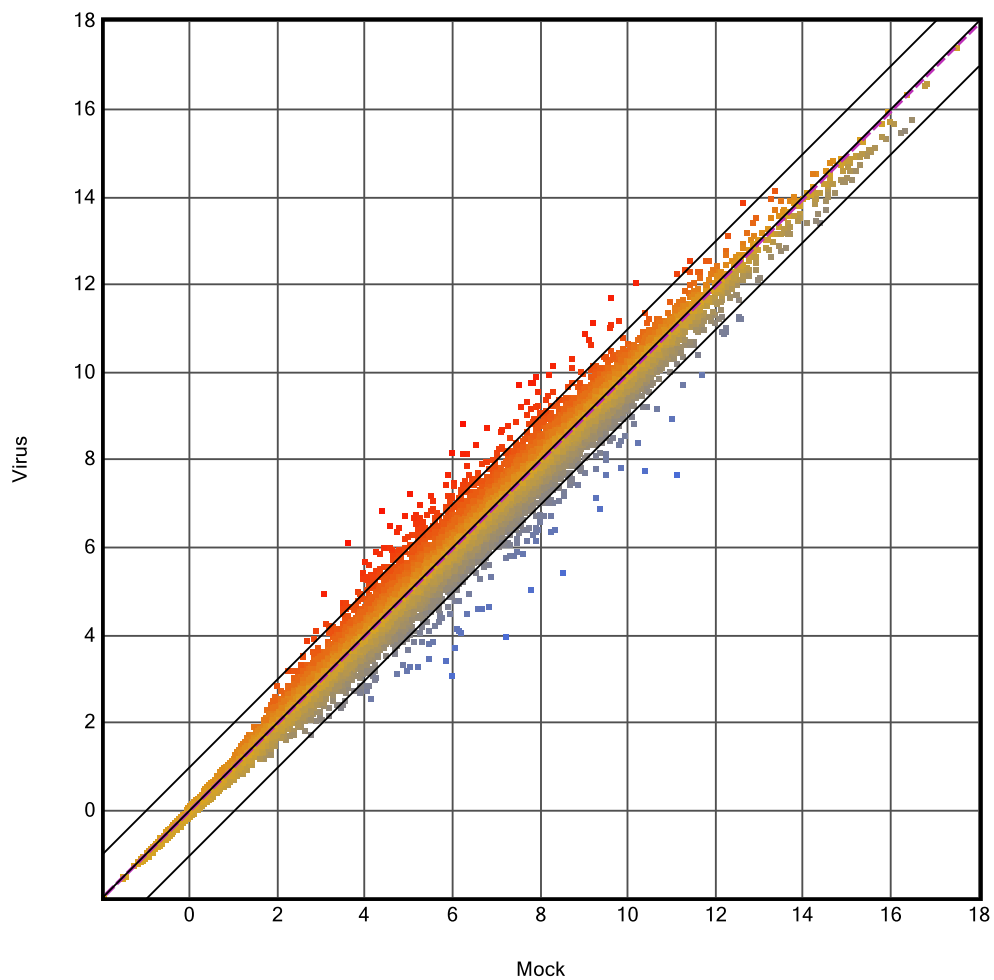


**Figura 6.** Curva padrão para a detecção de partículas de groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) via amplificação do gene da proteína N de GRSV em sistema de qPCR com sondas fluorescentes. Pontos em vermelho representam os pontos da diluição seriada 1:10 da curva ( $10^{10}$  e  $10^1$ ) do fragmento gBLOCK contendo uma sequência parcial da proteína N de GRSV. Pontos azuis demonstram as amostras de alfaca da cultivar ‘Salinas’ infectadas com o isolado de GRSV 1A.

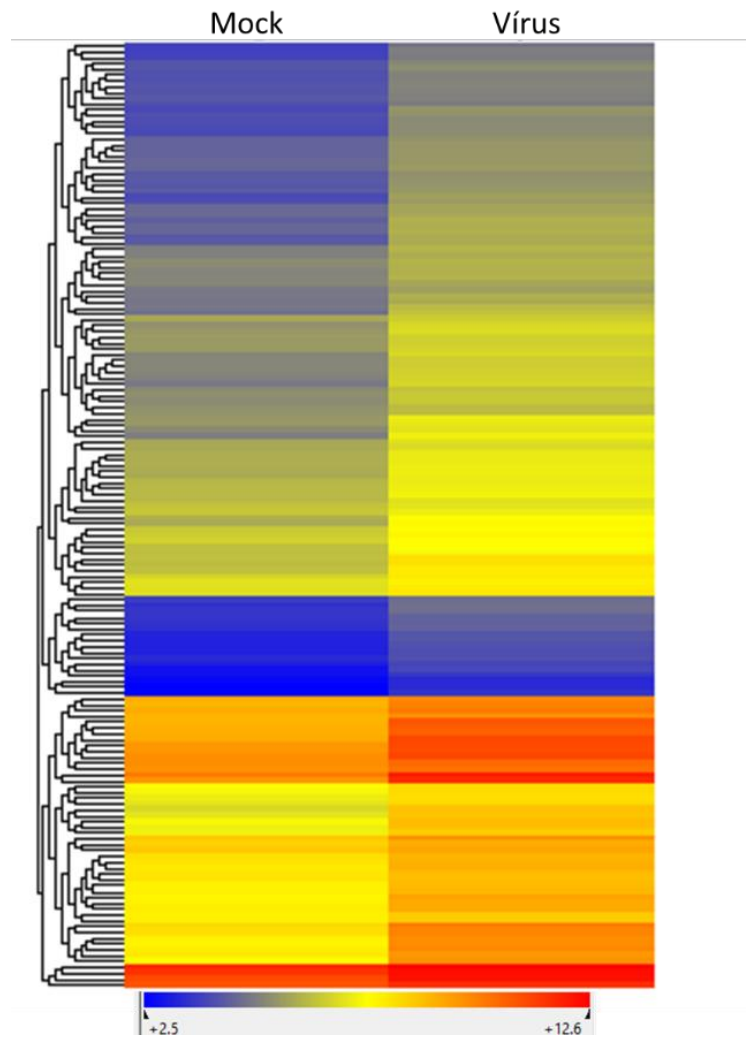




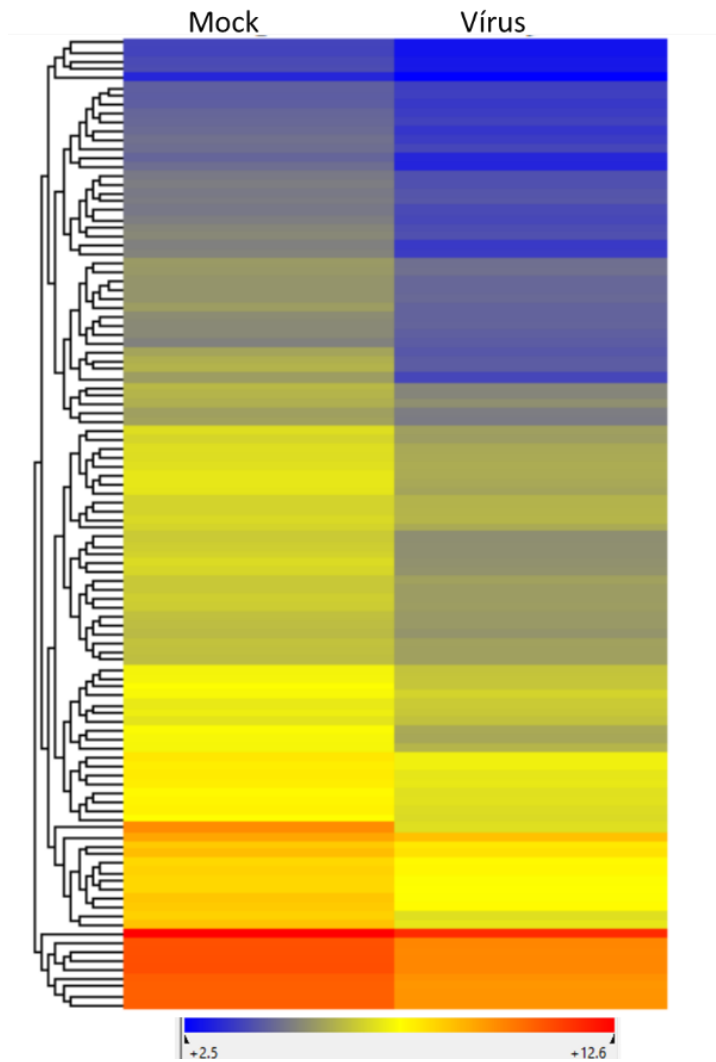
**Figura 7.** Pontos representativos do número de cópias de um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus obtidos em cada momento após inoculação em escala logarítmica. A linha pontilhada em vermelho corresponde à média de cópias de cada tempo após inoculação.



**Figura 8.** Gráfico Scatter plot demonstrando genes diferencialmente expressos obtidos 48 horas após a inoculação da alface cultivar ‘Salinas’ e um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus, a partir da análise com  $fold\ change \geq 1.5$  e  $p\ value \leq 0,05$ . Pontos vermelhos acima da linha diagonal superior na cor preta indicam os genes positivamente regulados. Pontos azuis abaixo da linha diagonal inferior indica os genes negativamente regulados.



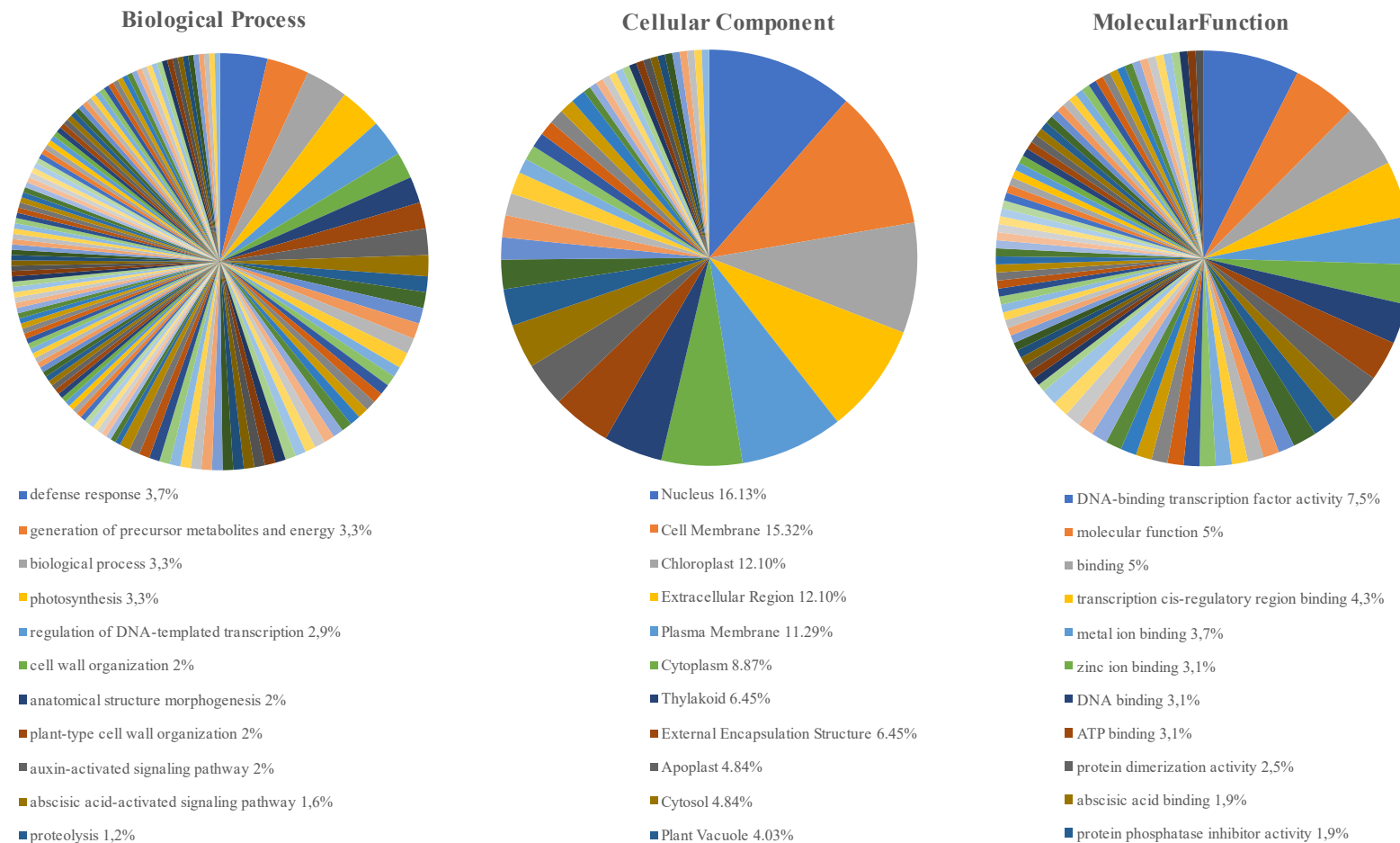
**Figura 9.** Mapa de calor (Heat Map) dos 162 genes positivamente regulados na interação suscetível entre a cultivar de alface ‘Salinas’ e o isolado de groundnut ringspot orthospovirus não inoculadas (mock-inoculadas).



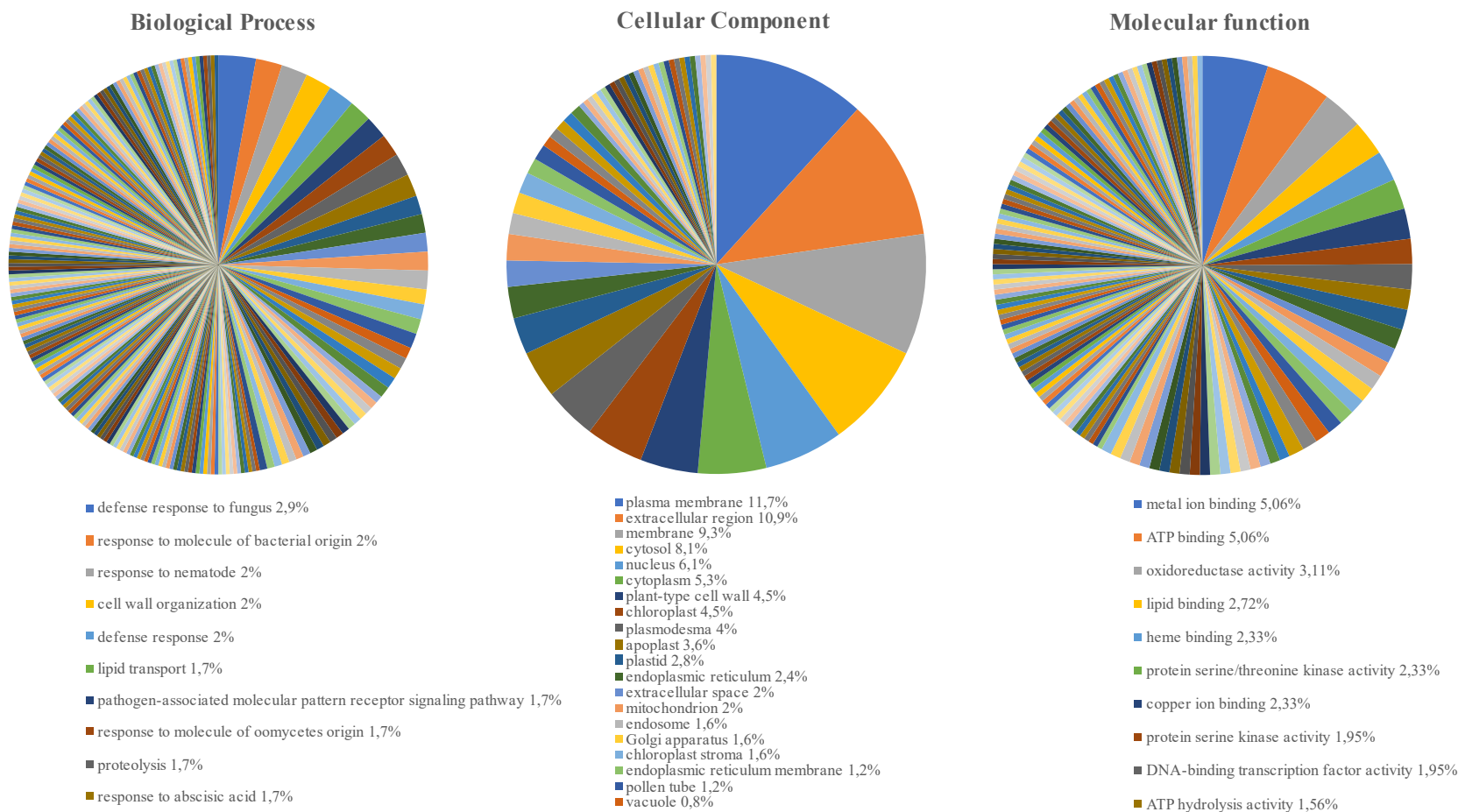
**Figura 10.** Mapa de calor (*Heat Map*) dos 110 genes negativamente regulados na interação suscetível entre a cultivar de alface ‘Salinas’ e o isolado de groundnut ringspot orthotospovirus plantas não inoculadas (mock-inoculadas).

**Tabela 1.** Total de *reads* mapeados na interação compatível entre um isolado de groundnut ringspot orthospovirus e a cultivar de alface ‘Salinas’ com o auxílio do genoma de referência de alface ‘Salinas’ v.11.

Biblioteca	Número total de <i>reads</i>	Total de <i>reads</i> mapeados	Total de <i>reads</i> não mapeados	<i>Reads</i> de baixa qualidade
48hR1	10.000.000	9.596.546	400.915	2.539
48hR2	10.000.000	9.677.785	319.948	2.267
48hR3	10.000.000	9.672.714	319.477	2.267
Total	30.000.000	28.947.045	1.040.340	7.073
48hMockR1	10.000.000	9.655.649	331.761	12.590
48hMockR2	10.000.000	9.601.568	385.707	12.725
48hMockR3	5.000.000	4.850.202	201.792	-
Total	30.000.000	24.107.419	919.260	25.315



**Figura 11.** Análise funcional dos DEGs negativamente regulados na interação compatível entre um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus e a cultivar de alfaca ‘Salinas’. Os termos obtidos foram divididos entre as categorias de processos biológicos, componentes celulares e função molecular no experimento de acordo com a base de dados UniProt.



**Figura 12.** Análise funcional dos DEGs positivamente regulados na interação compatível entre um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus e a cultivar de alface ‘Salinas’. Os termos obtidos foram divididos entre as categorias de processos biológicos, componentes celulares e função molecular no experimento de acordo com a base de dados UniProt.

**Tabela 2.** Genes diferencialmente expressos (48 horas após inoculação viral) na interação compatível entre GRSV e a cultivar de alface ‘Salinas’

Genes positivamente regulados			Genes negativamente regulados		
Código gene	Produto gênico	Fold change	Código gene	Produto gênico	Fold change
LOC111900240	phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)	2,446	LOC111877668	beta-fructofuranosidase soluble	2,641
LOC111915890	non-specific lipid-transfer protein	2,332	LOC111905063	polyphenol oxidase I chloroplastic;	2,419
LOC111897164	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 7	2,247	LOC111881608	WALLS ARE THIN (WAT) protein	2,055
LOC111915891	non-specific lipid-transfer protein	2,205	LOC111888215	expansin-A1	2,019
LOC111885768	Late embryogenesis abundant protein (LEA)	2,174	LOC111899681	cell wall protein/metal ion binding	1,947
LOC111881250	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1	2,163	LOC111877039	metalloendoproteinase	1,887
LOC128125933	non-specific lipid-transfer protein-like	2,132	LOC111914969	acetylserotonin O-methyltransferase	1,88
LOC128134124	non-specific lipid-transfer protein-like	2,126	LOC111890979	horcolin-like	1,874
LOC111915889	non-specific lipid-transfer protein	2,111	LOC111916523	expansin-A6	1,742
LOC111886056	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	2,076	LOC111884131	PQ-loop Superfamily	1,576
LOC111892699	probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	2,074	LOC111912031	endoglucanase 11	1,545
LOC111900337	BAG family molecular chaperone regulator 6	2,057	LOC111889610	sulfite exporter TauE/SafE	1,527
LOC128127569	mannose/glucose-specific lectin-like	2,014	LOC111888299	probable RNA-binding protein ARP1	1,49
LOC111893115	glutathione S-transferase L3	1,996	LOC111904155	basic blue protein	1,49
LOC111879707	6,7,8-trihydroxycoumarin synthase	1,991	LOC111877814	auxin-responsive protein	1,482
LOC111915172	stress response component 3-like [Daucus carota subsp. sativus]	1,966	LOC111916317	GDSL esterase/lipase	1,469
LOC111921764	putative glycine-rich cell wall structural protein 1	1,937	LOC111877045	serine/threonine-protein kinase	1,467
LOC111879601	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 5	1,91	LOC111897139	DEAD/DEAH box helicase	1,46
LOC111883576	GDSL esterase/lipase At5g55050	1,894	LOC111878485	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	1,436
LOC111897966	probable sulfate transporter 3.5	1,84	LOC111876156	transcription factor LHW	1,416



## **CAPÍTULO 5**

### **EXPRESSÃO DO GENE *Sw-5b* DO TOMATEIRO EM ALFACE E REAÇÃO DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS A UM ISOLADO DE GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV)**

**Expressão do gene *Sw-5b* do tomateiro em alface e reação das plantas transgênicas a um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV).**

**Tiago Silva Jorge**

Universidade de Brasília (UnB) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Instituto de Biologia – IB, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [tiagosiljorge@outlook.com](mailto:tiagosiljorge@outlook.com)

**Lídia Nascimento Queiroz**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [lidianqz@gmail.com](mailto:lidianqz@gmail.com)

**Mirtes Freitas Lima**

Embrapa Hortaliças (CNPH) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [mirtes.lima@embrapa.br](mailto:mirtes.lima@embrapa.br)

**Maria Esther de Noronha Fonseca**

Embrapa Hortaliças (CNPH) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [maria.boiteux@embrapa.br](mailto:maria.boiteux@embrapa.br)

**Leonardo Silva Boiteux**

Embrapa Hortaliças (CNPH) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [leonardo.boiteux@embrapa.br](mailto:leonardo.boiteux@embrapa.br)

**Francisco José Lima Aragão**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [francisco.aragao@embrapa.br](mailto:francisco.aragao@embrapa.br)

## RESUMO

Os orthotospovirus representam um dos principais complexos virais afetando o cultivo da alface (*Lactuca sativa* L.) no Brasil. A efetividade das medidas de manejo integrado destes patógenos na alface tem sido muito reduzida nas condições brasileiras devido indisponibilidade de fontes de resistência genética contra a espécie viral predominante – *Orthotospovirus arachianuli* (GRSV). Na ausência de cultivares convencionais resistentes ao GRSV, o emprego de ferramentas biotecnológicas inovadoras se apresenta como uma alternativa viável para gerar plantas resistentes via engenharia genética. Relatos em tomateiro indicam altos níveis de eficiência e estabilidade de acessos contendo o gene *Sw-5b* contra isolados de GRSV. No entanto, ainda não estão disponíveis relatos de mobilização via transgenia/cisgenia do gene *Sw-5b* para espécies não pertencentes à família Solanaceae. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi gerar, via engenharia genética, plantas de alface contendo o gene de resistência de amplo espectro *Sw-5b*. Oito eventos transgênicos gerados com a cultivar de alface suscetível ‘Verônica’ foram desafiados (via inoculação mecânica) com um isolado de GRSV em condições controladas em casa de vegetação. Os bioensaios envolveram de oito conjuntos de 48 plantas de cada evento, adicionados de três plantas controles (= mock-inoculadas) em cada grupo, mais um conjunto de testemunhas incluindo a cultivar ‘Verônica’ não transformadas (wild type – WT) e plantas da hospedeira universal – *Datura stramonium*. Amostras foliares foram coletadas duas semanas após a inoculação para confirmação de sintomas através de avaliação visual e teste sorológico dot-ELISA. As mesmas amostras foram também submetidas a extração de DNA para estimar a porcentagem de plantas transgênicas via PCR com o par de primers específicos para o gene *Sw-5b*. Após a visualização dos amplicons em gel de agarose, foi conduzida a extração de RNA total de plantas comprovadamente transgênicas que apresentaram (ou não) o desenvolvimento de sintomas visando detectar a presença de transcritos do gene *Sw-5b*. A porcentagem de plantas transformadas variou de acordo com a geração de autofecundação, sendo detectadas aproximadamente 90% das plantas contendo o gene *Sw-5b* no evento L1 T4. No entanto, os resultados indicaram que as plantas de alface transformadas com o gene *Sw-5b* apresentaram elevada suscetibilidade ao GRSV, com algumas poucas plantas assintomáticas. Transcritos do *Sw-5b* foram detectados tanto em plantas sintomáticas quanto em assintomáticas, indicando que a transferência do gene *Sw-5b* isoladamente não foi suficiente para conferir resistência ao GRSV em alface.

**Palavras-chaves:** Engenharia genética; GRSV; Resistência genética

## **The tomato *Sw-5b* gene expression in lettuce and reaction of transgenic plants to one groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) isolates.**

**Abstract** – The orthotospoviruses comprise one of the main viral complexes affecting the lettuce (*Lactuca sativa* L) crop in Brazil. The effectiveness of the integrated management measures for these pathogens in lettuce has been greatly reduced under Brazilian conditions due to the lack of sources of genetic resistance to the prevalent viral species – *Orthotospovirus arachianuli* (GRSV). In the absence of conventional cultivars with resistance to GRSV, the use of innovative biotechnological tools is a potentially viable alternative to generate resistant plants via genetic engineering. Reports in tomato indicate high levels of efficiency and stability of accessions containing the *Sw-5b* gene against GRSV isolates. However, there are still no reports of mobilization of the *Sw-5b* gene via transgenic/cisgenic approaches for non-Solanaceae species. In this context, the objective of the present work was to generate (via genetic engineering) lettuce plants containing the broad-spectrum resistance gene *Sw-5b*. Eight transgenic events of the susceptible lettuce cultivar ‘Verônica’ were challenged (via mechanical inoculation) with a GRSV isolate under controlled greenhouse conditions. The bioassays consisted of eight sets of 48 plants from each event, plus three control plants (= mock-inoculated) in each group, plus a set of controls including the non-transformed cultivar ‘Verônica’ (wild type – WT) and plants of the universal host – *Datura stramonium*. Leaf samples were collected two weeks after inoculation for confirmation of symptoms by visual assessment and serological dot-ELISA test. The same samples were also subjected to DNA extraction to estimate the percentage of transgenic plants via PCR with the pair of specific primers for the *Sw-5b* gene. After visualization of the amplicons in agarose gel, the extraction of total RNA from proven transgenic plants that presented (or not) the development of symptoms was carried out in order to detect the presence of transcripts of the *Sw-5b* gene. The percentage of transformed plants varied according to the selfing generation, with approximately 90% of the plants containing the *Sw-5b* gene in the L1 T4 event. However, the results indicated that lettuce plants transformed with the *Sw-5b* gene displayed high susceptibility to GRSV, with a few asymptomatic plants. *Sw-5b* transcripts were detected in both symptomatic and asymptomatic plants, indicating that *Sw-5b* gene transfer alone was not sufficient to confer GRSV resistance in lettuce.

**Keywords:** Genetic engineering; GRSV; Genetic resistance

## INTRODUÇÃO

Os orthospovirus constituem um dos principais complexos virais afetando o cultivo da alface (*Lactuca sativa* L.) no Brasil (Jorge et al., 2023). Levantamentos recentes têm indicado que membros da espécie *Orthospovirus arachianuli* (GRSV) também denominado como o agente causal predominante nas condições brasileiras (Lima et al. 2015; Lima et al. 2016; Martinez et al. 2019), sendo atualmente a espécie viral com maior distribuição em plantios na América Sul. No entanto, até o presente momento, fontes de resistência genética em germoplasma alface têm sido relatadas apenas para membros das espécies *Orthospovirus tomatomaculae* e *Orthospovirus impatiensnecromaculae* (O'Malley & Hartmann, 1989; Simko et al. 2018; Fontes et al. 2019; Martinez et al. 2019; Simko et al. 2023). Medidas de manejo integrado das orthospoviroses na cultura da alface demandam a adoção combinada de estratégias baseadas no controle químico do inseto vetor tripses (ordem *Thysanoptera*) e na remoção de hospedeiras alternativas (Resende & Pappu, 2021). Todavia, nas condições brasileiras, a efetividade dessas medidas na cultura da alface tem sido muito reduzida devido indisponibilidade de fontes de resistência GRSV que é a espécie predominante no Brasil (Lima et al., 2016, Martinez et al. 2019).

Neste atual cenário de ausência de cultivares convencionais resistentes ao GRSV, o emprego de ferramentas biotecnológicas inovadoras se apresenta como uma alternativa viável para gerar plantas resistentes via engenharia genética (Prins et al. 2007). Essa estratégia tem permitido a obtenção de plantas resistentes contra patógenos virais com maior eficácia e rapidez, promovendo a adoção de medidas de maior sustentabilidade, agregando valor ao produto comercializado e diminuindo custos de produção (Park et al. 2011; Faria et al. 2016). De maneira geral, a obtenção de plantas transgênicas resistentes à vírus baseia-se no conceito de “resistência derivada do patógeno” e no mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional

no qual um fragmento codificando o RNA/DNA do vírus é inserido no genoma da planta hospedeira, desencadeando uma resposta de supressão da atividade viral (Sandford & Johnston, 1985; Bonfim et al. 2007; Cruz & Aragão, 2014). Na cultura da alface, a engenharia genética tem sido utilizada com sucesso na obtenção de plantas resistentes a diferentes grupos de fitopatógenos, dentre eles, os orthotospovirus (Pang et al. 1996; Dias et al. 2006; Kawazu et al. 2009; Zhang et al 2010).

Outras estratégias visando a obtenção de plantas resistentes a patógenos virais envolvem a mobilização via transgenia de genes de resistência entre diferentes cultivares e/ou espécies vegetais (Schouten & Jacobsen, 2008). Genes de resistência atuam como proteínas sinalizadoras da segunda camada do sistema de defesa de plantas (ETI ou “effector-triggered immunity”), contribuindo com a identificação de padrões moleculares específicos, denominados de “efetores” (Jones & Dangl, 2006; Miller et al., 2017) ou fatores de avirulência, quando identificados pelo sistema de defesa da planta (Peiró et al. 2014; Hallwass et al. 2014; de Oliveira et al. 2016).

Diferentes genes de resistência (R-genes) já foram caracterizados como participantes da resposta de defesa contra processos de infecção viral em plantas (de Ronde et al., 2014; Hashimoto et al., 2016; Miller et al. 2017; Sett et al. 2022). Um dos fatores mais estudados tem sido o gene *Sw-5b* derivado do tomateiro selvagem *Solanum peruvianum* e que apresenta amplo espectro de resistência funcionado contra membros do gênero *Orthotospovirus* (Stevens et al. 1991; Boiteux et al., 1993; Brommonschenkel et al., 2000; Spassova et. 2001; de Oliveira et al., 2018). Estudos subsequentes sobre o mapeamento, herança e espectro de ação confirmaram a presença de um gene/locus dominante, de amplo espectro de ação, localizado dentro de um ‘cluster’ gênico composto de cinco cópias de genes análogos (*Sw-5a* até *Sw-5e*) no cromossomo

9 do tomateiro (Folkertsma et al., 1999; Brommonschenkel et al., 2000; Spassova et. 2001; Boiteux & Giordano, 1993; Dianese et al. 2011; Leastro et al. 2017). Experimentos de transformação de *Nicotiana benthamiana* utilizando os fatores presentes nessa região genômica permitiu descrever a cópia *Sw-5b* como sendo o fator determinante da resposta de defesa a infecção por orthotospovirus, sendo capaz de reconhecer a proteína de movimento dos orthotospovirus (NSm) e desencadear uma resposta de hipersensibilidade (Peiró et al. 2014; Hallwass et al. 2014; de Oliveira et al. 2016). Assim como a maioria dos genes de resistência dominantes descritos na literatura, o *Sw-5b* pertence à família *Nucleotide-binding/leucine rich repeat* (NB-LRR), atuando como molécula sentinela, responsável por desencadear uma cascata de reações de defesa que levam a respostas de hipersensibilidade (de Ronde et al., 2014). Tentativas de mobilização via transgenia do *Sw-5b* já foram realizadas com sucesso para plantas de fumo (*N. benthamiana*) condicionado resistência a membros da espécie *Orthotospovirus tomatomaculae* (Peiró et al. 2014; Hallwass et al. 2014; de Oliveira et al. 2016) e para a berinjela (*Solanum melongena*), onde foi demonstrado a eficiência desse gene no controle da infecção por membros da espécie *Orthotospovirus tomatoflavi* (Picoli et al. 2006).

Relatos de avaliações de germoplasma de tomateiros cultivados e silvestres do gênero *Solanum* (*Lycopersicon*) indicam altos níveis de eficiência e estabilidade de acessos contendo o gene *Sw-5b* contra isolados de GRSV (Dianese et al., 2010; 2011; Hallwass et al. 2014; de Oliveira et al. 2016). No entanto, ainda não estão disponíveis relatos da mobilização via transgenia/cisgenia do gene *Sw-5b* para espécies não pertencentes à família Solanaceae. Essa característica de efetividade contra o GRSV foi o estímulo inicial para desenvolver eventos transgênicos de alface contendo o gene *Sw-5b*, tendo como objetivo o desenvolvimento de materiais genéticos expressando o fenótipo de resistência contra esta espécie viral. Desta forma, o presente trabalho relata a efetiva mobilização do gene *Sw-5b* do tomateiro para o genoma da

alface e descreve os bioensaios conduzidos para caracterizar a expressão fenotípica desse fator de resistência em diferentes eventos transgênicos em uma cultivar suscetível de alface.

## MATERIAL & MÉTODOS

**Plantas de alface geneticamente modificadas com o gene *Sw-5b*** – Eventos transgênicos foram conduzidos utilizando a cultivar ‘Verônica’ no Laboratório de Engenharia Genética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando vetor otimizado para expressão de transgenes em alface (**Figura 1**). O protocolo para obtenção dos eventos foi baseado na metodologia descrita por Dias et al. (2006). A escolha do gene de interesse foi baseada na sequência do gene *Sw-5b* descrito por Spassova et al. (2001) (**Figura 2**). Foram obtidos oito eventos de transformação com o gene *Sw-5b*, com diferentes níveis de segregação (gerações segregantes) (**Tabela 1**).

**Preparo de mudas e condução do experimento** – As mudas foram obtidas a partir do semeio em bandejas de isopor contendo substrato comercial Basaplant, adicionado de adubo de liberação lenta Osmocote® (15-9-12). Para homogeneizar a germinação e quebrar a dormência características em sementes de alface, as bandejas foram condicionadas por 48h em ambiente escuro da câmara fria a 8°C. Após a germinação, as plantas foram transferidas individualmente para vasos de 300mL contendo solo autoclavado. O experimento foi conduzido em um set de cada evento com 48 plantas inoculadas, três plantas não inoculadas (mock-inoculadas), um grupo de testemunhas de alface não transformadas (WT) da cultivar ‘Verônica’ e plantas de *D. stramonium* como controle positivo da inoculação.



**Produção do inóculo e inoculação mecânica** – O inóculo foi produzido a partir de um isolado de GRSV caracterizado biológica e molecularmente, originário de uma planta de alface coletada na cidade de Pires do Rio–Goiás. A multiplicação foi realizada em plantas de *Datura stramonium* apresentando dois pares de folhas verdadeiras, com auxílio do abrasivo carborundum e tampão fosfato pH 7.4. Plantas de alface apresentando o primeiro par de folhas verdadeiras foram inoculadas com extratos de folhas de *D. stramonium* apresentando sintomas iniciais. Tecido foliar de *D. stramonium* foi macerado com auxílio de um pistilo e cadinho imersos em isopor com gelo, numa proporção de uma grama de folha para 10 mL de tampão fosfato pH 7.4. Um subgrupo de plantas de alface foi também mock-inoculado, empregando um extrato de folhas saudáveis de *D. stramonium*. Após 48 horas, este processo foi repetido, a fim de diminuir a possibilidade de escapes oriundos do processo de inoculação mecânica (Boiteux & de Ávila, 1994).

**Avaliação visual e confirmação de plantas sintomáticas via sorologia** – Para a confirmação de plantas infectadas, foi conduzida uma análise visual dos sintomas típicos de infecção por GRSV em alface aos 15 dias após a inoculação. Posteriormente, as amostras foliares foram coletadas em sacos plásticos e armazenadas em isopor com gelo para subsequente realização do teste sorológico Dot-enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA), seguindo a metodologia descrita por Almeida et al. 1995. O antissoro empregado foi produzido no Laboratório de Virologia Vegetal e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças, sendo específico para a proteína do nucleocapsídeo (proteína N) de GRSV. Com os dados obtidos, foram calculadas as percentagens de plantas positivas pelo teste sorológico, relacionando com os dados obtidos na avaliação visual.

**Coleta, extração de DNA e PCR** – Amostras dos eventos transgênicos e controles foram coletadas (discos foliares de 0,5 cm) e inseridas individualmente em microtubos de 1,5 mL, sendo um disco por amostra por tubo. Posteriormente, as amostras de DNA genômico foram extraídas utilizando um protocolo padrão com CTAB e solventes orgânicos (Boiteux et al., 1999) utilizando o homogeneizador PreCellys (Bertin Technologies). Após a extração, todas as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Fisher) e diluídas para a concentração 40 ng/ $\mu$ L. Em seguida, foi conduzida a reação de PCR, utilizando o par de primers *Sw-5b F* (5'–GTA CCT CGC AGT TCA GGC TT–3') e *Sw-5b R* (5'–GTA ACC CGG ATA GAG TGC GG–3'), com as seguintes condições: 1 ciclo de 1 minuto a 95 °C, seguidos por 35 ciclos de 30 segundos de 95 °C, 30 segundos de 55 °C, 30° segundos de 72 ° C, com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Como controles da reação foram utilizados DNAs genômicos extraídos da cultivar de tomateiro 'Santa Clara' (controle negativo; com uma cópia mutante do gene *Sw-5b*) e da isolinha resistente 'LAM 147' (controle positivo; homocigota para o gene *Sw-5b*). Como controle negativo adicional foi utilizado o DNA genômico extraído de plantas de alface cultivar 'Verônica' não transformadas ("wild-type"). O perfil de amplicons foi visualizado em gel de agarose 1,5%.

**Extração de RNA e RT-PCR** – Devido ao elevado número de amostras, apenas três eventos (L1, L11 e L6) foram selecionados para a condução da extração de RNA. As amostras foram subdivididas entre plantas com ou sem sintomas que foram identificadas como sendo transgênicas pela técnica de PCR. O tecido foliar foi armazenado em microtubos de 1,5 mL resfriados imediatamente em nitrogênio líquido e acondicionados em freezer -80°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a extração de RNA total com o kit ReliaPrep RNA Miniprep Systems (Promega), empregando-se 50 mg de tecido vegetal. A mensuração da

concentração e qualidade do RNA extraído foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Fisher).

**Confirmação da presença do RNA de Sw-5b nos eventos transgênicos de alface** – A verificação do produto gênico do *Sw-5b* foi realizada por intermédio de uma reação de RT-PCR One-Step utilizando o protocolo padrão do kit Access Quick (Promega) com o par de primers *Sw-5b* F (5'–GTA CCT CGC AGT TCA GG CTT–3') e *Sw-5b* R (5'–GTA ACC CGG ATA GAG TGC GG–3') que amplificam a região de 401 bases indicada na **Figura 2**. Para fins de detecção de resquícios de DNA e controle interno da reação de RT-PCR visando a detecção do produto gênico de *Sw-5b*, duas reações adicionais foram conduzidas. A primeira reação, visando a detecção de resquícios de DNA, foi realizada empregando-se o kit de RT-PCR sem a adição da enzima transcriptase reversa AMV, responsável pela síntese do cDNA. Para o controle da reação de transcriptase reversa, um par de primers do gene Actina de alface [forward (F): 5'–AGG GCA GTG TTT CCT AGT ATT GTT G–3' e reverse (R): 5'–CTC TTT TGG ATT GTG CCT CAT CT–3'] foi utilizado. A quantidade de RNA empregada em todas as reações foi padronizada para 300 ng. O perfil de amplicons obtido foi visualizado em gel de agarose 1,5%.

## RESULTADOS

**Confirmação da porcentagem de eventos transgênicos em gerações segregantes** – A presença do gene nas plantas transgênicas foi atestada por PCR com o par dos primers *Sw-5b* F e *Sw-5b*, obtendo-se amplicons de aproximadamente 401 pares de bases. Foi possível observar a presença de banda em todos os eventos transgênicos, plantas da cultivar 'Santa Clara', 'LAM 147' e testemunha *Sw-5b* (*S. peruvianum*) (**Figura 3**), indicando uma extrema conservação de

sequência para a região de anelamento dos primers, mesmo que dentro da região codificante para *Sw-5b* existam polimorfismos entre as isolinhas contrastantes (resistente versus suscetível). A porcentagem de plantas transgênicas comprovadas via PCR variou de acordo com a geração populacional, com total de plantas variando entre 31,25 e 90% de plantas transgênicas (**Tabela 2**). O evento que apresentou a maior porcentagem de plantas transgênicas confirmadas por PCR foi o evento L1 T4, estando em sua na quarta geração de autofecundação (**Figura 4**).

**Reação fenotípica de eventos transgênicos ao desafio com GRSV: Porcentagem de plantas infectadas confirmadas por avaliação visual e teste sorológico dot-ELISA** – Os resultados obtidos na análise visual demonstraram que a porcentagem de infecção dos eventos avaliados após o desafio com o isolado de GRSV foi aproximadamente 90 % de infecção (**Figura 5**). Os resultados obtidos na análise sorológica dot-ELISA confirmaram as observações visuais dos sintomas mostrando que a infecção mínima obtida por evento foi de aproximadamente 90% (**Figura 6**). As tabelas de cada evento foram construídas para discriminar a relação entre a presença/ausência de sintomas com a presença do gene *Sw-5b* em plantas comprovadamente *Sw-5b* (**Tabela 3**).

**Confirmação da expressão do gene *Sw-5b* em um subgrupo de plantas de alface sintomáticas e assintomáticas** – O perfil de amplicons obtidos da reação de RT-PCR permitiu observar que tanto em plantas de eventos em que houve o desenvolvimento da doença (L11, L1), quanto em eventos que não houve o desenvolvimento de sintomas (L6) apresentaram a presença da banda referente ao transcrito de *Sw-5b* (**Figura 7**). A efetividade da reação foi comprovada através da amplificação do gene endógeno Actina, sendo observado o amplicon esperado de aproximadamente 100 bp, comprovando a efetividade da reação de RT-PCR.

Resquícios de DNA advindos do processo de extração de RNA total não foram detectados, sendo constatado através da ausência de amplificação de bandas na reação de RT-PCR sem a adição da enzima transcriptase reversa AMV (L11-AMV e L6-AMV). da enzima transcriptase reversa AMV para verificar a amplificação de resquícios de DNA; **L6-AMV:** Reação de RT-PCR realizada sem a adição da enzima transcriptase reversa AMV para verificar a amplificação de resquícios de DNA.

## DISCUSSÃO

A mobilização de genes de resistência via engenharia genética se apresenta como uma importante medida na obtenção de plantas com resistência a vírus, possibilitando a inserção de genes não disponíveis em sistemas convencionais (Schouten & Jacobsen, 2008). No entanto, a efetividade deste método pode não ser adequada mesmo quando a transferência do gene de interesse é efetiva.

O sucesso da transferência do gene *Sw-5b* do tomateiro para a alface foi confirmado por PCR com primers específicos e via detecção dos transcritos. O cassete de transformação empregado no experimento foi construído com base na sequência clonada por Spassova et al. (2001), sendo esta sequência previamente mobilizada para plantas de *Nicotiana benthamiana* que apresentaram respostas de defesa após à inoculação com isolados de orthospovirus (Hallwass et al. 2014). A resposta de defesa em plantas transgênicas a inoculação com orthospovirus também já foram constatadas em plantas transformadas de beringela (*S. melongena*) com o gene *Sw-5b* (Picoli et al. 2006).

A detecção do transcrito mostra que a etapa de síntese de mRNA ocorreu tanto em plantas sintomáticas quanto em assintomáticas, indicando que a transferência do gene *Sw-5b* e sua

transcrição isoladamente não foi suficiente para conferir resistência ao GRSV em alface. A detecção da proteína Sw5 não foi realizada. Dessa forma a etapa de tradução (ou não) do gene permanece desconhecida. Todos os oito eventos de alface cultivar ‘Verônica’ apresentaram níveis elevados de incidência de sintomas em bioensaios envolvendo inoculação mecânica com um isolado de GRSV, não sendo possível observar respostas expressivas de defesa. A incidência geral do vírus no experimento foi de aproximadamente 90% em todos os eventos avaliados, com níveis semelhantes de incidência das testemunhas não transformadas, como foi comprovado através da avaliação visual e teste sorológico dot-ELISA.

O gene *Sw-5b* atua como uma molécula de reconhecimento do fator de avirulência NSm, todavia, os eventos decorridos após a detecção do fator de avirulência permanecem desconhecidos (Hallwass et al. 2014; de Oliveira al. 2016; 2018). A ineficácia da expressão do fenótipo da resistência em alface pode estar relacionada a mecanismos conservados em plantas da família Solanaceae e potencialmente ausentes e/ou não funcionais em plantas de alface (família Astareceae), podem ser abordados empregando-se o conceito de funcionalidade taxonômica restrita (restricted taxonomic functionality). Esse termo foi inicialmente proposto por Bonardi et al. (2011) para englobar proteínas NLR com função de ajudante (helper) do processo de resposta imune. Em *Arabidopsis*, a família ADR1 atua como helper para a resposta de defesas ativadas pelas proteínas *RPS2*, *RPP2* e *RPP4* (Bonardi et al. 2011, Chakraborty et al. 2018). Isso pode explicar possíveis proteínas helper conservadas e presentes na família Solanaceae, algo já observado na transferência do gene R *Bs2* de pimentão para tomate, conferindo resistência a mancha bacteriana (Tai et al. 1999). As respostas de defesa das plantas, incluindo respostas induzidas por patógenos virais (Kachroo et al. 2006) são reguladas por uma rede complexa de moléculas sinalizadoras bem como de reguladores transcricionais (Jalali et al., 2006; Joshi & Nayak, 2011). Os genes de resistência (R), tais como o *Sw-5b*, desempenham

um papel no reconhecimento específico do patógeno ou de variantes do patógeno e desencadeiam as respostas bioquímicas e fisiológicas de defesa (Brommonschenkel et al. 2000; Spassova et al. 2001; Jalali et al., 2006; Hallwass et al. 2014; de Oliveira et al. 2016). Desta forma, para a resposta de resistência ser efetiva se faz necessário que as vias de sinalização envolvendo moléculas-chave de sinalização tais como ácido salicílico, jasmonato e etileno estejam também funcionais e/ou que sejam efetivamente ativadas pela percepção de sinal do gene R (Jalali et al., 2006; Joshi & Nayak, 2011). Esse ‘crosstalk’ entre R-genes e as diferentes vias de sinalização leva a uma perfeita modulação da expressão de genes relacionados à indução dos mecanismos de defesa (Jalali et al., 2006; Joshi & Nayak, 2011). Neste contexto, uma das possíveis explicações para a não manifestação de resposta de resistência mediada pelo gene *Sw-5b* em alface pode estar relacionada pela interrupção do ‘cross talk’ entre esse gene e genes relacionados com vias metabólicas cruciais para a expressão da resistência. No entanto, é interessante notar que respostas de defesa funcionais já foram obtidas em plantas de alface transformadas com o gene *Mi-1.2* (Zhang et al 2010) que confere resistência contra 13 espécies do gênero *Meloidogyne* (Gabriel et al., 2020) e que apresenta uma estreita relação de homologia com o gene *Sw-5b* (Brommonschenkel et al. 2000).

No presente estudo não foram avaliados o efeito de dosagem do gene *Sw-5b*, devido à ausência de ferramentas para análise do número de cópias inseridas. Da mesma forma, não foi possível determinar se as plantas transgênicas apresentavam o gene *Sw-5b* em homozigose ou heterozigose. Essas informações podem ajudar a esclarecer a não manifestação fenotípica da resistência ao GRSV. Também não foi possível mensurar possíveis efeitos moduladores de outros genes sobre a ação do gene *Sw-5b*, dada à ausência de informação sobre a região genômica onde o gene foi inserido nos diferentes eventos. No entanto, análises suplementares seguem em curso, bem como a transformação de tomates suscetíveis com este cassete, para a

finalização e completa elucidação dos fatores que condicionaram uma não efetividade do Sw-5b em plantas transformadas da cultivar 'Verônica'.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brommonschenkel, S. H., Frary, A., Frary, A., Tanksley, S. D. (2000). The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 13(10), 1130–1138.
- Boiteux, L. S., Giordano, L. B. (1993). Genetic basis of resistance against two Tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, 71(1-2), 151–154.
- Boiteux, L. S., de Avila, A. C. (1994). Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense* ‘PI 159236’. **Euphytica**, 75(1-2), 139-142.
- Boiteux, L. S., Fonseca, M. E. N., Simon, P. W. (1999). Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 124(1), 32–38.
- Bonardi, V., Tang, S., Stallmann, A., Roberts, M., Cherkis, K., Dangl, J. L. (2011). Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108(39), 16463-16468.
- Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E. O., Mendes, É. A., Aragão, F. J. (2007). RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 20(6), 717–726.
- Chakraborty, J., Jain, A., Mukherjee, D., Ghosh, S., Das, S. (2018). Functional diversification of structurally alike NLR proteins in plants. **Plant Science**, 269, 85-93.
- Cruz, A. R. R., & Aragão, F. J. L. (2014). RNA i-based enhanced resistance to Cowpea severe mosaic virus and Cowpea aphid-borne mosaic virus in transgenic cowpea. **Plant Pathology**, 63(4), 831–837.

De Oliveira, A. S., Koolhaas, I., Boiteux, L. S., Caldararu, O. F., Petrescu, A. J., Oliveira Resende, R., Kormelink, R. (2016). Cell death triggering and effector recognition by *Sw-5* SD-CNL proteins from resistant and susceptible tomato isolines to Tomato spotted wilt virus. **Molecular Plant Pathology**, 17(9), 1442–1454.

De Oliveira, A. S., Boiteux, L. S., Kormelink, R., Resende, R. O. (2018). The *Sw-5* gene cluster: Tomato breeding and research toward orthotospovirus disease control. **Frontiers in Plant Science**, 9, 1055.

de Ronde, D., Butterbach, P., Kormelink, R. (2014). Dominant resistance against plant viruses. **Frontiers in Plant Science**, 5, 307.

Dianese, E. C., de Fonseca, M. E. N., Goldbach, R., Kormelink, R., Inoue-Nagata, A. K., Resende, R. O., Boiteux, L. S. (2010). Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. **Molecular Breeding**, 25, 133–142.

Dianese, E. C., Fonseca, M. E. N., Inoue-Nagata, A. K., Resende, R. O., Boiteux, L. S. (2011). Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species. **Euphytica**, 180, 307–319.

Dias, B. B. A., Cunha, W. G., Morais, L. S., Vianna, G. R., Rech, E. L., De Capdeville, G., Aragão, F. J. L. (2006). Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, 55(2), 187-193.

Faria, J. C., Aragão, F. J. L., Souza, T. L. P. O., Quintela, E. D., Kitajima, E. W., Ribeiro, S. D. G. (2016). Golden mosaic of common beans in Brazil: Management with a transgenic approach. **APS Features** 10:1094. <https://doi.org/10.1094/APSFeature-2016-10.Plant>

Folkertsma, R. T., Spassova, M. I., Prins, M., Stevens, M. R., Hille, J., & Goldbach, R. W. (1999). Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. Stevens and its application to physically map the *Sw-5* locus. **Molecular Breeding**, 5, 197–207.

Fontes, M. G., Cabral, C. S., Lima, M. F., Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S. (2019). Phenotypic expression and species-specific reaction of *Lactuca sativa* 'PI 342444' to groundnut ringspot virus (GRSV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates. **European Journal of Plant Pathology**, 155, 231–238.

Gabriel, M., Kulczynski, S. M., Muniz, M. F., Boiteux, L. S., Carneiro, R. M. (2020). Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi-1.2* gene to 15 *Meloidogyne* species. **Plant Pathology**, 69(5), 944–952.

Galvez, L. C., Banerjee, J., Pinar, H., Mitra, A. (2014). Engineered plant virus resistance. **Plant Science**, 228, 11–25.

Hallwass, M., De Oliveira, A. S., Dianese, E. C., Lohuis, D., Boiteux, L. S., Inoue-Nagata, A. K., Kormelink, R. (2014). The Tomato spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NSM) triggers a hypersensitive response in *Sw-5*-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional *Sw-5b* resistance gene copy. **Molecular Plant Pathology**, 15(9), 871–880.

Hashimoto, M., Neriya, Y., Yamaji, Y., Namba, S. (2016). Recessive resistance to plant viruses: potential resistance genes beyond translation initiation factors. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1695.

Jalali, B. L., Bhargava, S., Kamble, A. (2006). Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. **Journal of Phytopathology**, 154(2), 65–74.

Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. **Nature**, 444, 323–329.

Jorge T.S., Queiroz L.N., Lima M.F., Fonseca M.E.N., Fontes M.G., Pereira-Carvalho R.C., Kitajima E.W., Aragão, F.J.L., Boiteux L.S. (2023). Classical and biotechnological breeding of tomato, *Capsicum*, and lettuce for resistance to orthotospoviruses in Brazil. In: Silva HR; Almeida LC, Rios JA, Michereff SJ. (Org.). **Manejo de doenças de plantas: Controle genético, químico e biológico, nas perspectivas acadêmica e empresarial**. 1ed. Recife-PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco, v. 1, p. 7–26.

Joshi, R. K., Nayak, S. (2011). Functional characterization and signal transduction ability of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat resistance genes in plants. **Genetics and Molecular Research** 10(4), 2637–2652.

Kachroo, P., Chandra-Shekara, A. C., Klessig, D. F. (2006). Plant signal transduction and defense against viral pathogens. **Advances in Virus Research**, 66, 161–191.

Kawazu, Y., Fujiyama, R., Noguchi, Y., Kubota, M., Ito, H., Fukuoka, H. (2010). Detailed characterization of Mirafiori lettuce virus-resistant transgenic lettuce. **Transgenic Research**, 19(2), 211–220.

Leastro, M. O., De Oliveira, A. S., Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A., Kormelink, R., Resende, R. O. (2017). The NSm proteins of phylogenetically related tospoviruses trigger *Sw-5b*-mediated resistance dissociated of their cell-to-cell movement function. **Virus Research**, 240, 25–34.

Lima, M.F.; Barriolli, C.C.; Fontes, M.G.; Boiteux, L.S.; Almeida, J.M. (2015) A five-year survey of tospoviruses infecting vegetable crops in main producing regions of Brazil. p. 117. In: **Book of Abstracts Xth International Symposium on Thysanoptera & Tospoviruses**. Asilomar, Pacific Grove, CA: USDA–ARS. v. 1.

Lima, M. F.; Michereff-Filho, M.; Boiteux, L. S.; Suinaga, F. A. (2016) Doença vira-cabeça em alface: Sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle. **Embrapa: Circular Técnica Número 153**, 16 pp.

Miller, R. N. G., Costa Alves, G. S., Van Sluys, M. A. (2017). Plant immunity: Unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. **Annals of Botany**, 119(5), 681-687.

Pang, S. Z., Ja, F. J., Carney, K., Stout, J., Tricoli, D. M., Quemada, H. D., Gonsalves, D. (1996). Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. **The Plant Journal**, 9(6), 899–909.

Pappu, H. R., Jones, R. A. C., Jain, R. K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**, 141(2), 219–236.

Peiró, A., Cañizares, M. C., Rubio, L., López, C., Moriones, E., Aramburu, J., & Sánchez-Navarro, J. (2014). The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. **Molecular Plant Pathology**, 15(8), 802–813.

Picoli, E. A. T., Lima, G. S. A., Lau, D., Oliveira, J. C. F., Laia, M. L., Zerbini, F. M., Otoni, W. C. (2006). Resistance gene *Sw-5* of tomato confers resistance to TCSV in *Solanum melongena*. **International Journal of Horticultural Science** 12, 41–47.

Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. **Molecular Plant Pathology**, 9(1), 73–83.

Raymond Park, J., McFarlane, I., Hartley Phipps, R., Ceddia, G. (2011). The role of transgenic crops in sustainable development. **Plant Biotechnology Journal**, 9(1), 2–21.

Resende, R.O., Pappu, H.R. Orthotospoviruses (Tospoviridae) (2021) In: Bamford, D. H., Zuckerman, M. (editors), **Encyclopedia of Virology**. Academic Press.

Sanford, J. C., Johnston, S. A. (1985). The concept of parasite-derived resistance—Deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, 113(2), 395.

Schouten, H. J., Jacobsen, E. (2008). Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding. **Trends in Plant Science**, 13(6), 260–261.

Sett, S., Prasad, A., Prasad, M. (2022). Resistance genes on the verge of plant–virus interaction. **Trends in Plant Science** 27: 1242–1252.

Simko, I., Hasegawa, D. K., Peng, H., Zhao, R. (2023). Genetic and physiological determinants of lettuce partial resistance to *Impatiens necrotic spot virus*. **Frontiers in Plant Science**, 14,

1163683.

Spassova, M. I., Prins, T. W., Folkertsma, R. T., Klein-Lankhorst, R. M., Hille, J., Goldbach, R. W., & Prins, M. (2001). The tomato gene *Sw5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. **Molecular Breeding**, 7, 151–161.

Tai, T. H., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M. C., Staskawicz, B. J. (1999). Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96(24), 14153-14158.

Zhang, L. Y., Zhang, Y. Y., Chen, R. G., Zhang, J. H., Wang, T. T., Li, H. X., & Ye, Z. B. (2010). Ectopic expression of the tomato *Mi-1* gene confers resistance to root knot nematodes in lettuce (*Lactuca sativa*). **Plant Molecular Biology Reporter**, 28, 204–211.

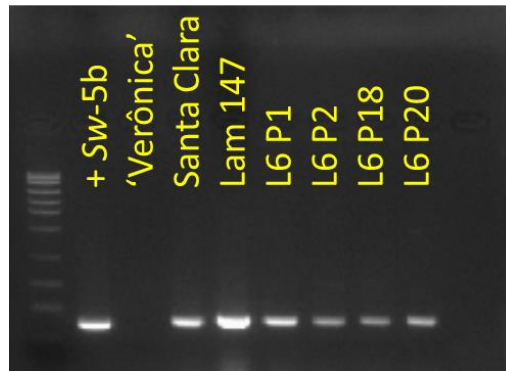


**Figura 1.** Representação esquemática do vetor utilizado para superexpressão do gene *Sw-5b* de *S. peruvianum* em alface ‘Veronica’. A sequência codificante de *Sw-5b* está sob controle do promotor constitutivo ACT2 (actina 2) de *Arabidopsis thaliana* (*AtACT2*). O cassete de expressão foi clonado no vetor pCambia3300, que contém o gene *bar* que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio e que foi empregado para seleção de plantas transformadas. O gene *bar* está sob controle do promotor constitutivo do RNA 35S de *Cauliflower mosaic virus* (35SCaMV) e sequência terminadora do gene codificante paranopalina sintase (nos3’) de *Agrobacterium tumefaciens*.

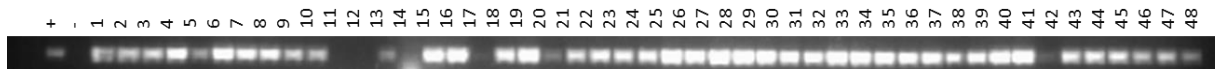
>atggctgaaaatgaaattgaggaaatgftagacacctgagaaggatcaagagtggaggtgatctggattggctgacatattgcga  
attgaggaacttgaatggtgctaagagttttagaacctttacaagataatgatgtctttgcctgattccttagtcgaactcacaaga  
gggcccattgattggggaatacttcaccggftggttggtaggattccacataatgtaaaactaaccttaactagaaaggctagaatc  
acatttggtaattcttcaaggtaatacggcaagtttaagtcacaattatgagttgaataatgatctgtcgaatatatggattgtctgga  
aaatcttaaatgatgtactgatgatgtcttgcaaaaggataggttctccattccagagaacaacttgcaaaacatcgaataaaagga  
actgaaaattgtcaaaagaaataagatgttgaatacatatgcccagagataatgggttatgtcactatgagaagcaggaatgtt  
tggagaatcgaattcagttcatgactaacctgtgggacaatattgttggcagtagattatgtcactgagggtaaacttaagaaga  
aatgacaacttagtaaacctccttacctattatcattgattgttagtgaggctggaaatgaagaagattttcatggtgaagtaagcctt  
caaagttactcaatcaaaaactttcaaggacaagaaattacaaaaggattttcacatcatctccacaatctgttgatgtatctcagaaca  
aaaagctcgagaattttcctaataatcgtctcctcaaaaattgatggcaatagagttctgttggtttcttgatgctgatgtgcaaat  
catgttataatggtaactggtgaaaaaggcttgttaaaagggtggagctatagcgggtgatattctatatgaattcaaaagcttctcctag  
atcaataaacaaagatgaaactagcaacataagtcttctcaatacagatattggagaagactaaagatctgaaggcacaagttgagac  
gtactacaatccttaaaattactcctcagttcccaccttgggtgattgagcttctgaattccttttaaggaaactgaatgagatgt  
cgacatcgaagtcggattaggttctctgatgaaacctcttttagggaattggagaagagctatcatctcttacatcca ttttagagaagg  
agctctcatcatttccgtgatgtcgtgcacatgaacataacattcctaaagatctcagaggcgtaccatcaattgtcatatgaggctg  
agggtgctattgattctattctgtcagataatgctttttgcatatgtttgtcacttctacaattgaaaagagatcaagcaaatatgca  
gaggtgactgagatgtggtcagcggacattccttaactcctactatgtggctgtccattaaaacatctgccggatcgacatagcaatc  
ttgtaactgatgaggaggtagtggttttgagaataaagcagaagaactaattgattatctgattagagggtacaaatgagctagacggtgt  
cccaattgtaggcattggaggacaagggaaaacgacaattgctagaagttgtacaataatgacattattgtttctcgtttgatgttcga  
gcatggtgcatcatttctcaaacgtataatcggagagagtattacaagatatttcagcaagttacaggtccgacgacaatggagctac  
ggttgatgttctccgacatgttgaggagaaaatgaatgggaaagagatctcattgtattggatgatatgtgggattgatggtatggg  
atgacttaaggctttctttccagatgatggaatgaagcagaatagtcgtaacaactcacttgaagaagtggttaagcaagtaagta  
cctactgatccttattctctccattcctcacaacagaagagaggtgccaattgttcagaaaaagtggttcaaaaggaagattgccgc  
ctgaactacaagatgtgagtcgaagcagtagcagaaaaatgcaaggactgccctagtgggtgcttggtagctggaaatacaaaaa  
aggaaaaatggaagaatcttggtggaatgaggtgaaagatgcttatttactatcttgacagtgagttcgaagaatacagctcggcaacta  
tgcagttgagtttgataacttaccactgtttaaagccttgcctctttatattgggaatgtttcggaggacgcaagaattccagcatctaca  
ttgataagttatggattgctgaaggattcgtggagaactgaatctgggagattaatggaagaggaagctgaaggttacttgatggatc  
tcattagcagtaacttgtaatgcttcaaaagagaactataagggttagagtcacaactgtcaggttcatgatgttgatcacttttgcct  
ggaaaagagtagagaagcaagttatgcttgcagtgaaagggtcaatatacattttcaaccttcggattggaagggaactcagtgag  
cttcagtttagtgaaagccttcaagttgcactctgtctccaaaacacagaagcctttccatcaacacttgaggtcattgataacgac  
caatcgagcaaaatctataatgatatttctctgtcagattagtgaaatgagcttctaaagtcttggatttgagttctatattgtggagttt  
tgccttagctacattcaaacactaaatcagctgaa **gtacctcgcagttcaggtt** ttgaattctattttagatccaggatcacatctcccca  
tatagaaacttcttgaatgaatctccttattatgatattgttaccagtgctttttgggaaatgaaaaaattaaggcatgctcattttgga  
aggctgaattgacaagcaggggctctctgaagatctctaaattgaaaattgaggatattaagaatattgttgatttgatagggtg  
gatgtgtatcaaggaggtgtcctaacttcaacaactcaaatcacatatttgggaataatgaagagccttttgcctcaaatggagaatc  
ttaccagcttcaacaactcaacttcttgcgcgtcc **ccgcaactctatccgggttac** agttgccttcaaatgaataagttggtactga  
aggaattcatataggatgttattccctcattgcccgaactaccaagcctggaatattcctcagttacatgatgtgttttctcaatcagaa  
gagtggtgccttgagatatacagttccataaacttaagttgtgaaactggtaaagttaaatatacaagggtggatgtctcagaggaaatc  
attccggttcttgaacactcgtataaagaagtgcaattgacctagaggagattcacttagcttctgatattccaacattggaacagatt  
aaattgattgggtcctgaaagtatctctggaggattcagctgtgagaatgaaggaagaatcaagacactgaaggatgtatcgttta  
cacctcgtcaacaacgctcagattga<.

**Figura 2.** Sequência completa do gene *Sw-5b* clonado por Spassova et al. 2001 e presente na cultivar de tomate ‘Stevens’. Em destaque (campo laranja e fonte vermelha) a região de anelamento dos primers utilizados para a detecção nas plantas transgênicas de alface e as isolinhas controles de tomateiro.





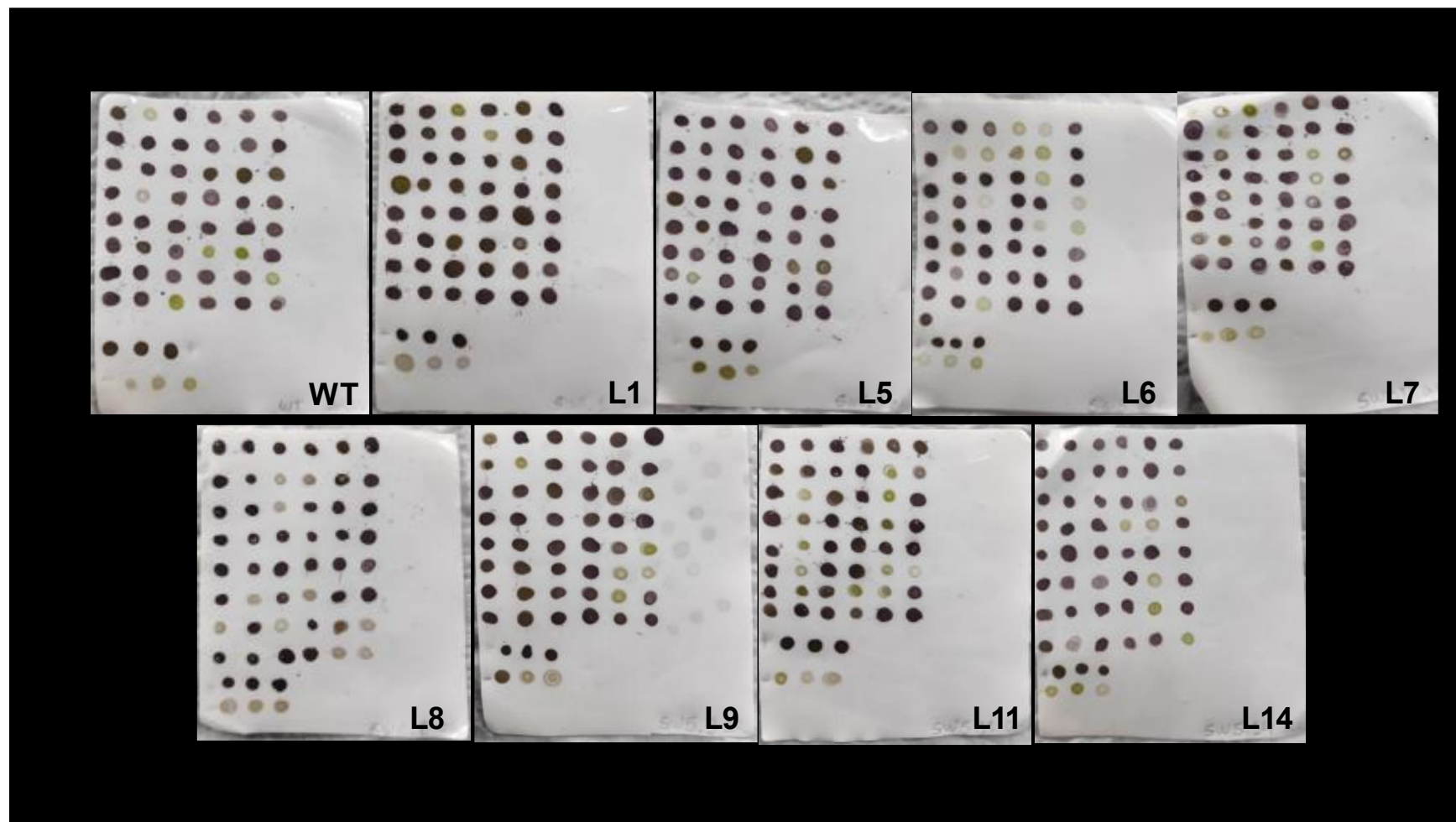
**Figura 3.** Perfil de amplicons obtidos na reação de PCR com o par de primers Sw-5bF e Sw-5bR. **+Sw-5B:** Controle positivo; **'Vêronica':** alface não transformada; **'Santa Clara':** cultivar de tomate suscetível à diferentes espécies de orthotospovirus. **'LAM 147':** Isolinha homozigota para o gene *Sw-5b* com amplo espectro de resistência. **L6P1 e L6P2:** Eventos transgênicos que apresentaram de sintomas. **L6P18 e L6P20:** Eventos transgênicos que não apresentaram sintomas.



**Figura 4.** Perfil de amplicons (400 pares de bases) obtido por PCR com o par de primers Sw-5bF e Sw-5bR do evento L1 T4 da cultivar de alface ‘Verônica’.

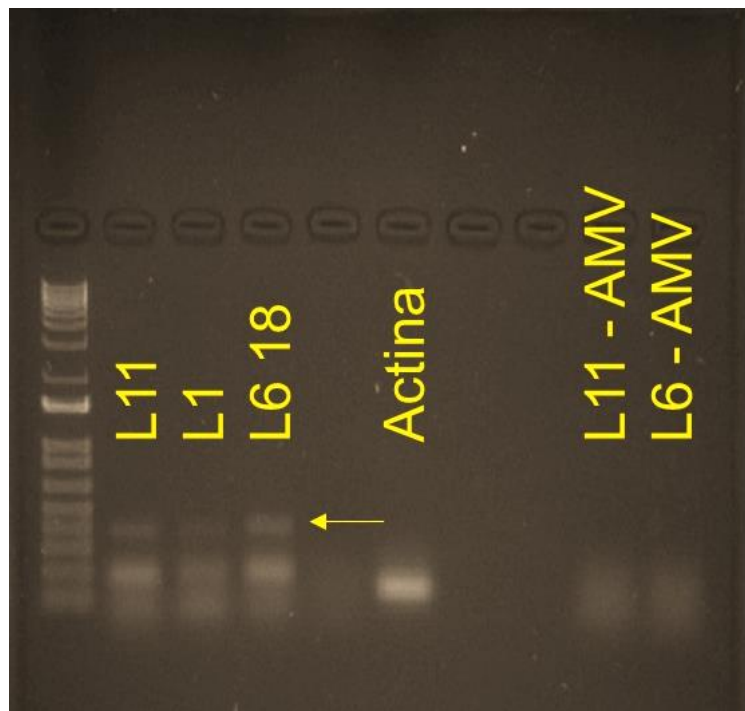


**Figura 5.** Reação de plantas não transformadas (WT) e de oito eventos transgênicos de alfaca (L1, L5, L6, L7, L8, L9, L11 & L14) frente a inoculação mecânica com um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus. Plantas remanescentes foram não apresentaram detecção de carga viral pelo teste sorológico dot-ELISA. São observados os sintomas de intensa clorose e morte das plantas. Maior frequência de plantas assintomáticas foi observado no evento L6.



**Figura 6.** Detecção do antígeno viral de GRSV em teste sorológico dot-ELISA realizado com antissoro específico para proteína N em plantas não transformadas (WT) e em oito eventos transgênicos de alfafa (L1, L5, L6, L7, L8, L9, L11 & L14) após inoculação mecânica com um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus . Cada ponto presente na membrana é originário de uma amostra individual de alfafa. Pontuações arroxeadas indicam a presença do vírus na amostra, e amostras na tonalidade verde, indicam a ausência do vírus. As duas últimas colunas são os controles positivos (três penúltimos pontos) e negativos (três últimos pontos).





**Figura 7.** Perfil de amplicons obtidos na reação de RT-PCR com o par de primers *Sw-5b F* e *Sw-5b R*. **L11:** Amostra de planta sintomática; **L1:** Amostra de planta sintomática; **L6 18:** Amostra de planta assintomática; **Actina:** Reação de RT-PCR com RNA extraído da Planta L6 18 utilizando o par de primers de actina. **L11-AMV:** Reação de RT-PCR realizada sem a adição da enzima.

**Tabela 1.** Eventos transgênicos da alface cultivar ‘Verônica’ empregados no ensaio de reação a infecção por isolado de GRSV em condições controladas de inoculação.

Geração de autofecundação	Eventos							
	1	5	6	7	8	9	11	14
T1								X
T2		X		X	X		X	
T3			X			X		
T4	X							

**Tabela 2.** Porcentagem de plantas transformadas em eventos transgênicos de alface da cultivar ‘Verônica’ em diferentes gerações de autofecundação, através da reação de PCR com os primers *Sw-5bF* e *Sw-5bR*.

<b>Evento</b>	<b>Porcentagem de plantas transgênicas</b>
<b>L1 T4</b>	90
<b>L5 T2</b>	80
<b>L6 T3</b>	52
<b>L7 T2</b>	62,5
<b>L8 T2</b>	---
<b>L9 T3</b>	31,25
<b>L11 T2</b>	52
<b>L14 T1</b>	68,75

**Tabela 3.** Comparação dos resultados obtidos de avaliação visual, PCR para a confirmação do evento transgênico e reação do teste sorológico dot-ELISA visando discriminar plantas que não apresentassem sintomas tanto na avaliação visual, quanto no teste sorológico do evento L6. Plantas positivas para *Sw-5b* e negativas tanto na avaliação do teste dot-ELISA e avaliação visual ao final do experimento foram destacadas na cor cinza, sendo realizado a extração de RNA total para detecção do produto gênico do gene *Sw-5b* via RT-PCR. Plantas assinaladas em campo cinza (18, 20 e 45) podem representam potenciais indivíduos resistentes ou escapes. Progênies destas plantas serão avaliadas em futuros ensaios.

Planta	Reação dot-ELISA	PCR <i>Sw-5b</i>	Avaliação Visual Doença
01	+	+	+
02	+	+	+
03	+	+	+
04	+	-	+
05	+	+	+
06	+	-	+
07	+	-	+
08	+	+	+
09	+	-	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	-	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	+	-	+
17	+	-	+
18	-	+	-
19	+	+	+
20	-	+	-
21	+	-	+
22	+	-	+
23	+	+	+
24	-	+	+
25	-	-	+
26	-	+	+
27	+	+	+
28	+	-	+
29	+	-	+
30	+	+	+
31	+	-	+
32	+	+	+
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	+



<b>36</b>	+	+	+
<b>37</b>	-	-	+
<b>38</b>	+	-	+
<b>39</b>	+	+	+
<b>40</b>	+	-	+
<b>41</b>	+	-	+
<b>42</b>	+	+	+
<b>43</b>	+	-	+
<b>44</b>	-	-	+
<b>45</b>	-	+	-
<b>46</b>	+	+	+
<b>47</b>	+	-	+
<b>48</b>	+	-	+

---

## **CAPÍTULO 6**

**NOVAS ESPÉCIES HOSPEDEIRAS EXPERIMENTAIS E BUSCA POR  
FONTES DE RESISTÊNCIA AO GROUNDNUT RINGSPOT  
ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV) EM GERMOPLASMA DE *Solanum*  
(SUBGÊNERO *Leptostemonum*).**

**Novas espécies hospedeiras experimentais e busca por fontes de resistência ao groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) em germoplasma de *Solanum* (subgênero *Leptostemonum*).**

**Tiago Silva Jorge**

Universidade de Brasília (UnB) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Instituto de Biologia – IB, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [tiagosiljorge@outlook.com](mailto:tiagosiljorge@outlook.com)

**Maria Geane Fontes**

Universidade de Brasília (UnB) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [geane\\_fontes@yahoo.com](mailto:geane_fontes@yahoo.com)

**Mirtes Freitas Lima**

Embrapa Hortaliças (CNPH) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [mirtes.lima@embrapa.br](mailto:mirtes.lima@embrapa.br)

**Maria Esther de Noronha Fonseca**

Embrapa Hortaliças (CNPH) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [maria.boiteux@embrapa.br](mailto:maria.boiteux@embrapa.br)

**Leonardo Silva Boiteux**

Embrapa Hortaliças (CNPH) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília–DF, Brazil.

E-mail: [leonardo.boiteux@embrapa.br](mailto:leonardo.boiteux@embrapa.br)

## RESUMO

Os cultivos de espécies de solanáceas de fruto (especialmente o tomateiro, a berinjela e o jiló) sofrem com inúmeros problemas de origem biótica, sendo os orthospovirus um dos grupos de patógenos mais relevantes nas condições brasileiras. A espécie viral relatada com maior disseminação e relevância econômica são isolados de *Orthospovirus arachianuli* (GRSV). O manejo das orthospoviroses requer a adoção combinada de várias técnicas, mas o emprego de cultivares e/ou porta-enxertos resistentes tem sido isoladamente a estratégia com maior sustentabilidade. As espécies do “grupo das solanáceas espinhosas” ou “jurubebas” (pertencentes ao gênero *Solanum* subgênero *Leptostemonum*) têm sido usadas como porta-enxertos para culturas como tomate, berinjela e jiló devido ao amplo espectro de resistência contra patógenos de solo. No entanto, recentemente, a espécie *Solanum stramonifolium* (“joá-vermelho”) foi identificada como hospedeira natural do GRSV, expressando severos sintomas. A potencial suscetibilidade dessas espécies aos orthospovirus pode afetar a eficácia destes porta-enxertos em condições de cultivo comercial. Neste contexto, o presente trabalho visou investigar, via bioensaios de inoculação mecânica, a presença de potenciais fontes de resistência em acessos de *Solanum* (*Leptostemonum*) e expandir o conhecimento sobre o círculo de espécies hospedeiras de GRSV neste germoplasma. A maioria das espécies avaliadas apresentou elevados níveis de suscetibilidade. Os sintomas observados variaram, incluindo deformação foliar, clorose, pontos cloróticos e necróticos, bem como afilamento de folhas. Apenas três acessos foram identificados como promissores para fins de melhoramento genético devido aos menores valores de incidência e severidade. As espécies *S. macrocarpon*, *S. acanthodes*, *S. viarum*, *S. subinerme* e *S. sisymbriifolium* foram identificadas com sendo altamente suscetíveis ao GRSV, expandindo as informações sobre o círculo de hospedeiras alternativas desse patógeno viral. O presente estudo representa uma contribuição para os esforços de melhoramento genético visando o desenvolvimento de porta-enxertos de *Solanum* (*Leptostemonum*) resistentes ao GRSV.

## **New experimental host species and search for sources of groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) resistance in *Solanum* (subgenus *Leptostemonum*) germplasm**

### **ABSTRACT**

Solanaceous crops for fruit production (especially tomato, eggplant, and scarlet eggplant) suffer from numerous problems of biotic origin, with orthotospoviruses being one of the most relevant groups of pathogens under the Brazilian conditions. The viral species reported with greater dissemination and economic relevance is the *Orthotospovirus arachianuli* (GRSV). The management of orthotospoviruses requires the combined adoption of several techniques, but the use of resistant cultivars and/or rootstocks has been the most sustainable strategy. Species of the group of “spiny solanaceous” or “jurubebas” (belonging to the genus *Solanum* subgenus *Leptostemonum*) have been used as rootstocks for crops such as tomato, eggplant, and scarlet eggplant due to their large-spectrum resistance to soil pathogens. However, recently, the species *Solanum stramonifolium* was identified as a natural host of GRSV, displaying severe symptoms. The potential susceptibility of these species to orthotospoviruses may affect the effectiveness of these rootstocks under commercial growing conditions. In this context, the present work aimed to investigate, via mechanical inoculation bioassays, the presence of potential sources of resistance in accessions of *Solanum* (*Leptostemonum*) and to expand knowledge about the range of host species of GRSV in this germplasm. Most species evaluated showed high levels of susceptibility. Observed symptoms varied, including leaf deformation, chlorosis, chlorotic and necrotic spots, as well as leaf thinning. Only three accessions were identified as promising for breeding purposes due to lower incidence and severity values. The species *S. macrocarpon*, *S. acanthodes*, *S. viarum*, *S. subinerme*, and *S. sisymbriifolium* were identified as being highly susceptible to GRSV, expanding the information on the circle of alternative hosts of this viral pathogen. The present study represents a contribution to genetic improvement efforts aimed at developing GRSV-resistant *Solanum* (*Leptostemonum*) rootstocks.

## INTRODUÇÃO

A produção de hortaliças no Brasil é caracterizada pela diversidade de culturas cultivadas em uma mesma área, tanto em cultivo convencional em condições de campo aberto, quanto sob cultivo protegido ou em sistemas hidropônicos (de Melo & Vilela, 2007). Diferentes patógenos acometem este grupo de vegetais, ocasionando perdas na qualidade e quantidade do produto comercializado, dentre eles, os orthospovirus que representam um dos principais complexos virais acometendo uma ampla gama de hospedeiras no Brasil e mundo (Pappu et al 2009; King et al., 2011; Oliver & Whitfield, 2016). Sua constituição genômica é composta por três segmentos de RNA fita simples, circundados por um envelope glicoproteico de proteínas Gn/Gc com partículas em formato esférico de diâmetro entre 80–120 nm. Os segmentos são classificados de acordo com seu tamanho relativo em S (small,  $\approx$  2,9kb), M (medium,  $\approx$  4,8kb) e L (large,  $\approx$  8,9kb). O RNA S é ambisenso, precursor da proteína não estrutural supressora de silenciamento gênico (NSs) na orientação senso positivo, enquanto na orientação senso negativo é precursor da proteína do nucleocapsídeo N (regulação dos processos de transcrição e replicação). O RNA M é ambisenso, sendo precursor das glicoproteínas Gn e Gc na orientação senso negativo e uma segunda proteína não estrutural (NSm) na orientação senso positivo, responsável pela competência no movimento célula-a-célula. O RNA L é senso negativo, precursor da polimerase dependente do RNA viral (RdRp) (de Avila et al., 1992; Kormelink et al., 2011). Estes vírus são transmitidos exclusivamente por insetos denominados tripses, que apenas em estado larval adquirem competência na transmissão, sendo classificada como circulativa-propagativa (Wijkamp et al., 1995).

Diversas culturas de importância econômica como tomateiro, pimentão e alface são acometidas por diferentes membros do gênero *Orthospovirus* (Jorge et al. 2023). No Brasil, a diversidade

de plantas acometidas por membros do gênero *Orthospovirus* no Brasil foi relatada através de um levantamento realizado por Kitajima (2020). Dentre os membros, isolados de *Orthospovirus tomatomaculae* (TSWV), *Orthospovirus arachianuli* (GRSV) e *Orthospovirus tomatoflavi* (TCSV) acometem uma ampla gama de hospedeiras de plantas, em sua maioria hortaliças das famílias Solanaceae e Asteraceae bem como leguminosas e plantas daninhas (Kitajima, 2020). Levantamentos realizados no Brasil indicam que a principal espécie presente em cultivos comerciais é o GRSV (Lima et al. 2015; Martinez et al. 2019; Jorge et al., 2023a). O manejo de orthospovirose é um processo oneroso, demandando a integração de diferentes medidas baseadas no controle do inseto vetor tripses, na remoção de plantas infestantes e no emprego de materiais contendo genes de resistência (Resende & Pappu, 2021). No entanto, a disponibilidade de materiais com resistência de amplo espectro atua como importante medida no emprego de medidas efetivas de controle.

O gênero *Solanum* é o mais numeroso dentro da família Solanaceae, sendo composto por mais de 1.400 espécies, incluindo plantas de importância econômica (Hawkes, 1999). Um grupo importante de espécies neotropicais engloba membros do gênero *Solanum* subgênero *Leptostemonum*, também referido como o “grupo das solanáceas espinhosas” (Agra et al., 2009). Muitas das espécies do subgênero *Leptostemonum* são dotadas de variáveis densidades e topologia de espinhos sendo conhecidas, de maneira geral, como “jurubebas” (Agra et al., 2009) A espécie *Solanum stramonifolium* (“joá-vermelho”) é uma jurubeba de frutos de coloração vermelha (Agra et al., 2009) que foi recentemente identificada como uma hospedeira natural do GRSV (Fontes, 2017).

Acessos de espécies do subgênero *Leptostemonum* estão sendo empregados como porta-enxertos para o tomateiro, berinjela e jiló devido a ampla resistência a patógenos de solo (Lopes

& Mendonça, 2016; Pereira et al., 2018; Pinheiro et al., 2020). Neste contexto, a suscetibilidade dessas espécies aos diferentes orthospovirus pode representar um fator de redução do potencial sucesso dessa tecnologia. Portanto, a busca por novas fontes de resistência bem como a caracterização da amplitude da gama de hospedeiras de orthospovirus configura-se como uma importante ação de pesquisa em *Solanum* (subgênero *Leptostemonum*). No presente capítulo descrevemos 11 novas hospedeiras naturais e experimentais de GRSV pertencentes ao grupo das jurubebas (solanáceas espinhosas) classificadas no gênero *Solanum* (subgênero *Leptostemonum*).

## MATERIAL & MÉTODOS

**Material vegetal** – No presente experimento, acessos de 11 espécies de *Solanum* (subgênero *Leptostemonum*) pertencentes ao banco de germoplasma de jurubebas da Embrapa Hortaliças foram avaliados quanto a reação após inoculação mecânica com um isolado caracterizado da espécie GRSV (**Tabela 1**) em condições de casa de vegetação.

**Produção das mudas e estabelecimento do bioensaio** – Para a produção de mudas de jurubebas, foram utilizadas bandejas de isopor preenchidas com substrato comercial Basaplant e adubo de liberação lenta Osmocote® (15N-9P-12K). As plantas de jurubeba apresentaram padrões diferenciados em sua germinação, sendo transplantadas 10 dias após a germinação, de acordo com o requerido por cada acesso, para vasos de 300 mL de solo autoclavado. Optou-se pelo delineamento experimental de blocos casualizados, contendo duas repetições de cinco plantas distribuídas aleatoriamente.



**Produção do inóculo, inoculação e avaliação da incidência via teste dot-ELISA** – A multiplicação de inóculo se deu em plantas de *D. stramonium* inoculadas com auxílio do abrasivo carborundum e tampão fosfato 0.01 M pH 7.4 + 0.1 % sulfito de sódio com a fonte original do isolado caracterizado. As plantas de jurubeba foram inoculadas aos 15 dias após o transplântio. O inóculo foi preparado por meio da maceração de 1g de folhas de *D. stramonium* sintomáticas em 10mL de tampão fosfato 0.01 M pH 7.4 + 0.1 % de sulfito de sódio. Após 48 horas, repetiu-se o processo de inoculação com o objetivo de mitigar possíveis escapes (Boiteux & de Ávila 1994). Duas semanas após a inoculação foi avaliada a incidência da doença através da coleta de folhas apicais para a realização de teste sorológico dot- Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Amostras de folhas apicais de todas as plantas avaliadas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em isopor com gelo e encaminhadas para o laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Hortaliças. A metodologia empregada no teste dot-ELISA foi descrita por Almeida et al. 1995, utilizando-se antissoro policlonal específico para a proteína do nucleocapsídeo de GRSV, produzido no laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Hortaliças. Ao final do experimento, todas as plantas foram fotografadas para caracterização de sintomas.

## RESULTADOS

Todos os acessos avaliados apresentaram suscetibilidade a infecção por GRSV, com médias de incidência em torno de 100% a partir dos dados obtidos no teste dot-ELISA, exceto, os acessos *Solanum macrocarpon* (CNPH 445), *Solanum ciliatum* (CNPH 055) e *Solanum viarum* (CNPH 185), com valores de 66%, 66% e 83% de plantas infectadas, respectivamente. Os sintomas apresentados pelos acessos variam entre deformação foliar, clorose, pontuações cloróticas, pontuação necróticas e afilamento de folhas (cordão de sapato) (**Figura 1**).

## DISCUSSÃO

O manejo mais eficiente e ambientalmente correto das orthospoviroses tem sido através do emprego cultivares contendo genes de resistência (Resende & Pappu, 2021; Jorge et al., 2023b). No entanto, a disponibilidade de materiais com resistência de amplo espectro é encontrada apenas em cultivares híbridas de tomateiro introgridas com o gene de resistência *Sw-5*, e em plantas híbridas de pimentão introgridas com o gene *Tsw*, que confere resistência do tipo espécie-específica a TSWV (Boiteux & de Avila, 1994; Dianese et al. 2011). Aspectos epidemiológicos na transmissão de orthospoviroses também atuam como importante medida no emprego de medidas efetivas de controle, via reconhecimento da gama de hospedeiras. Levantamentos realizados no Brasil indicam que a principal espécie presente em cultivos comerciais é o GRSV (Lima et al. 2015; Martinez et al. 2019). Diferentes hipóteses tentam elucidar este comportamento, sendo a predominância da espécie *Frankliniella schultzei* a mais indicativa, devido a maior competência na transmissão e aquisição de partículas de GRSV (Nagata et al. 2004).

No presente trabalho, todos os acessos avaliados no presente apresentaram altos níveis de incidência após a inoculação com o isolado de GRSV. Os acessos avaliados de *S. macrocarpon* (CNPH 445), *S. ciliatum* (CNPH 055) e *S. viarum* (CNPH 185) que apresentaram valores de 66%, 66% e 83% de incidência, respectivamente, deverão ser reavaliados para confirmar essa reação como respostas de resistência ou como possíveis escapes, uma vez que acessos silvestres comumente apresentam níveis variáveis de diversidade genética. Acessos de jurubeba têm sido comumente utilizados tanto como porta-enxertos quanto em cruzamentos para obtenção de híbridos interespecíficos em culturas como o tomateiro e berinjela, devido a sua resistência a

diferentes doenças ocasionadas por patógenos de solo (Lopes & Mendonça, 2016; Pereira et al. 2018; Pinheiro et al., 2020). No entanto, o relato da resistência ou gama de hospedeiras não havia sido realizada com isolados de GRSV para todas as espécies avaliadas no presente estudo.

Plantas de jurubeba foram previamente relatadas como hospedeiras naturais ou experimentais de orthospoviroses já foram realizadas previamente para os membros das espécies TSWV (*S. ciliatum* e *S. lycocarpum*), *Orthospovirus impatiensnecromaculae* (*S. stramoniiifolium*), GRSV (*S. sessiliflorum*, *S. palinacanthum*, *S. lycocarpum*) e TCSV (*S. palinacanthum*) (Mertelik et al. 2000; Boari et al. 2002; Eiras et al. 2002; Parrella et al. 2003; Farias, 2013; Fontes, 2017; Kitajima, 2020). No entanto, este é o primeiro relato mundial como hospedeiras experimentais de GRSV para as espécies *S. macrocarpon*, *S. acanthodes*, *S. viarum*, *S. subinerme* e *S. sisymbriifolium*. O reconhecimento destas espécies semi-perenes como potenciais hospedeiras possibilita também o delineamento de medidas adequadas de manejo tais como a remoção destas plantas da circunvizinhança de plantios comerciais de culturas sabidamente suscetíveis ao GRSV. Desta forma, o presente trabalho expande as informações sobre o círculo de plantas hospedeiras e de manejo do GRSV, representando também uma contribuição para os esforços de melhoramento genético visando o desenvolvimento de porta-enxertos de *Solanum* (*Leptostemonum*) mais resistentes/tolerantes a esse patógeno viral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA MF, NURIT-SILVA K, BERGER LR. 2009. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta Botanica Brasilia** 23: 826-842.

ALMEIDA AMR. 1995. Noções de sorologia aplicadas a fitovirologia. Londrina: Embrapa-CNPSO. 105 p.

BOARI, A. J., MACIEL-ZAMBOLIM, E. U. N. I. Z. E., LAU, D. D., LIMA, G. S., KITAJIMA, E. W., BROMMONSCHENKEL, S. S., & ZERBINI, F. M. 2002. Detection and partial characterization of an isolate of Groundnut ringspot virus in *Solanum sessiliflorum*. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 249-253.

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.

DE ÁVILA A, HAAN P.D, KITAJIMA E, KORMELINK R, RESENDE R.D.O, GOLDBACH R, PETERS D. 1992. Characterization of a distinct isolate of Tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. **Journal of Phytopathology** 134: 133–151.

DE MELO, PCT, VILELA, NJ. 2007. Importância da cadeia produtiva brasileira de hortaliças.

DIANESE EC, FONSECA MEN, INOUE-NAGATA AK, RESENDE RO, BOITEUX LS. 2011. Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species. **Euphytica**, 180, 307–319.

EIRAS M, CHAVES AL, COLARICCIO A, HAKAKAVA R, ARAUJO JD, CHAGAS CM. 2002. Caracterização do Tomato chlorotic spot virus isolado de jiló no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 285-291.

FARIAS, PC. Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros Potyvirus e Tospovirus e estudos de caracterização de vírus em Mimosa

caesalpinifolia. 2013. 71 f., il. Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

FONTES, MG. 2017. Estudo da interação tospovírus–tomateiro: Análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de groundnut ringspot virus (GRSV). Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília. 214 p.

HAWKES JG. 1999. The economic importance of the family Solanaceae. In: NEE M; SYMON DE; LESTER RN; JESSOP JP (eds). Solanaceae IV Advances in Botany and Utilization. Royal Botanic Gardens, Kew, Surrey, Reino Unido.

JORGE TS, FONTES MG, LIMA MF, BOITEUX LS, FONSECA MEN, KITAJIMA EW. 2022. Natural infection of *Cichorium intybus* (Asteraceae) by groundnut ringspot virus (Genus *Orthotospovirus*) isolates in Brazil. *Plant Disease*, 106(7), 2005.

JORGE TS, LIMA MF, BOITEUX LS, FONSECA MEN, KITAJIMA EW. 2021. First Report of *Cichorium endivia* (Asteraceae) as a natural host of Groundnut ringspot orthotospovirus in Brazil. *Plant Disease*, 105(3), 714-714.

JORGE, TS, REIS LDNA, FONTES MG, MELO FFS, NERY FMBDS, PEREIRA CARVALHO RDC, LIMA MF. 2023a. Confirmation of groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) infection in eggplant cultivars in Brazil. *Plant Disease* 107: 2567

JORGE TS, QUEIROZ LN, LIMA MF, FONSECA MEN, FONTES MG, PEREIRA-CARVALHO RC, KITAJIMA EW, ARAGÃO, FJL, BOITEUX LS. 2023b. Classical and biotechnological breeding of tomato, *Capsicum*, and lettuce for resistance to orthotospoviruses in Brazil. In: SILVA HR; ALMEIDA LC, RIOS JA, MICHEREFF SJ. (Org.). **Manejo de doenças de plantas: Controle genético, químico e biológico, nas perspectivas acadêmica e empresarial**. 1ed. Recife-PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco, v. 1, p. 7–26.

KING, AM, LEFKOWITZ, E, ADAMS, MJ, CARSTENS, EB. 2011. **Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** 9: 1326p.

KITAJIMA, EW. 2020. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, 20(2).

KORMELINK R, GARCIA ML, GOODIN M, SASAYA T, HAENNI AL. 2011. Negative-strand RNA viruses: The plant-infecting counterparts. **Virus Research** 162:184–202.

LIMA, M, MICHEREFF FILHO, M, BOITEUX, L, SUINAGA, F. 2016. Doença vira-cabeça em alface: sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica**. 16p.

LIMA, MF; BARRIOLLI, CC; FONTES, MG; BOITEUX, LS; ALMEIDA, JM. 2015. A five-year survey of tospoviruses infecting vegetable crops in main producing regions of Brazil. p. 117. In: Book of Abstracts **X<sup>th</sup> International Symposium on Thysanoptera & Tospoviruses**. Asilomar, Pacific Grove, CA: USDA–ARS. v. 1.

LOPES CA, MENDONÇA JL. 2016. Reação de acessos de jurubeba à murcha bacteriana para uso como porta-enxerto em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, 34, 356-360.

MARTINEZ RT, DE ALMEIDA MM, RODRIGUEZ R, CAYETANO X, DE OLIVEIRA A S, SILVA JM, RESENDE RO. 2019. Analyses of orthotospovirus populations and dispersion under different environmental conditions in Brazil and in the Dominican Republic. **Tropical Plant Pathology**, 44, 511-518.

MERTELIK J, MOKRA V, GOTZOVA B, GABRIELOVA S. 2000. Occurrence and identification of Impatiens necrotic spot tospovirus in the Czech Republic. In: X International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants, **Acta Horticulturae** 568: 79-83.

NAGATA, T, ALMEIDA, ACL., RESENDE, RDO, DE ÁVILA, AC. 2004. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, 53(2):136-140.

OLIVER, JE, WHITFIELD, AE. 2016. The genus Tospovirus: emerging bunyaviruses that threaten food security. **Annual Review of Virology**, 3:101-124.

PAPPU HR, JONES RAC, JAIN RK. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research** 141:219–36.

PARRELLA G, GOGNALONS P, GEBRE-SELASSIE K, VOVLAS C, MARCHOUX G. 2003. An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. **Journal of Plant Pathology**, 227-264.

PEREIRA, R. B., PINHEIRO J. B., TORRES T. B., MENDONÇA J. L., LUCAS G. C.; GUIMARÃES J. A. 2018. Potential of wild *Solanum stramonifolium* accesses as rootstock resistant to soilborne pathogens in tomato crops. **Horticultura Brasileira** 36: 235-239.

PINHEIRO, J. B., DA SILVA, G. O., DE JESUS, J. G., BISCAIA, D., E MELO, R. A. D. C. 2020. Resistance sources to root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in *Solanum* species. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 32(4): 303-308.

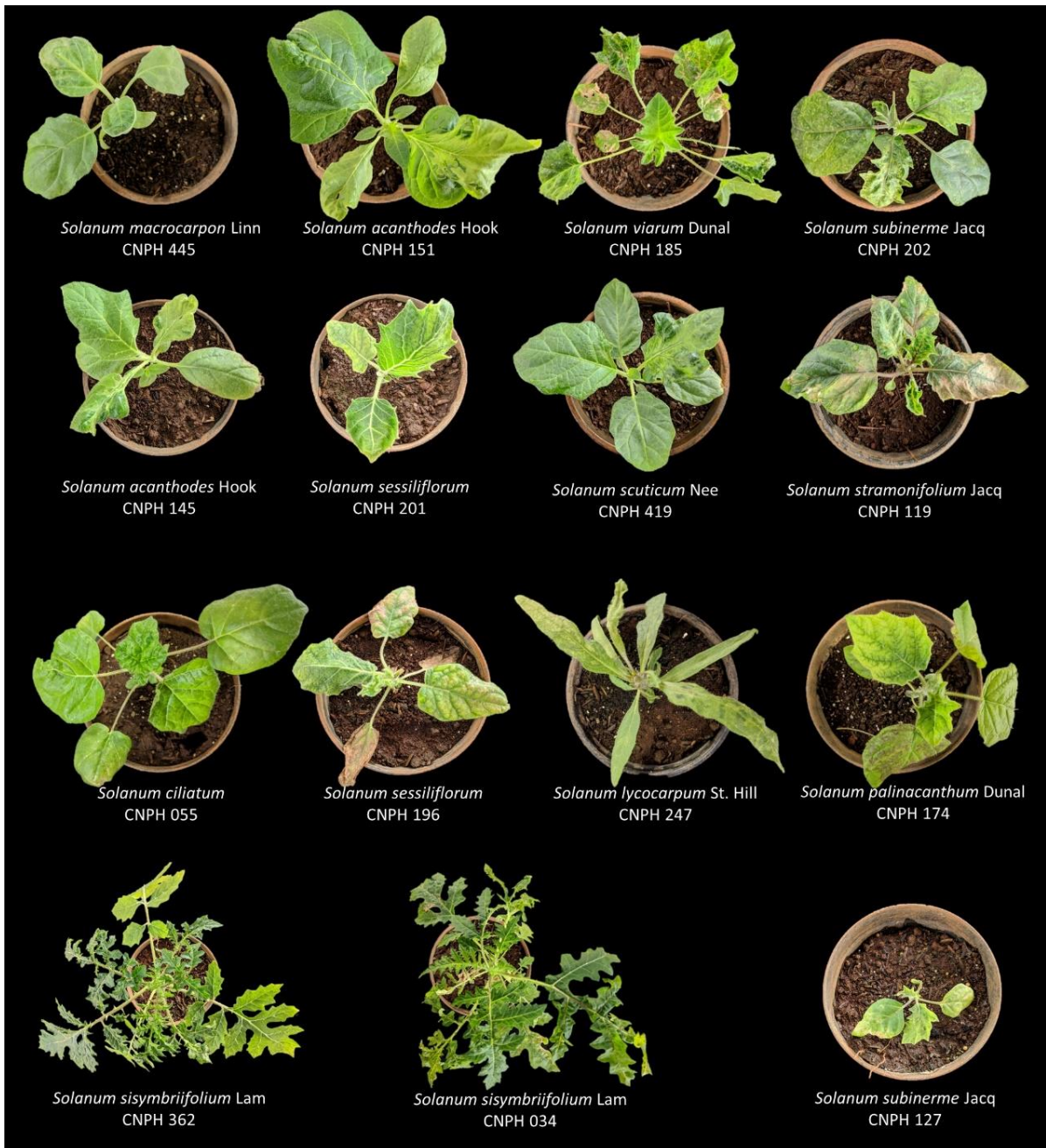
RESENDE, R.O., PAPPU, H.R. Orthotospoviruses (Tospoviridae). 2021. In: Bamford, D. H., Zuckerman, M. (editors), **Encyclopedia of Virology**. Academic Press.

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

**Tabela 1.** Lista de acessos de jurubebas (*Solanum* subgênero *Leptostemonum*) avaliadas no experimento com inoculação mecânica de um isolado de groundnut ringspot virus (GRSV).

<b>Nome científico</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Código do acesso</b>
<i>Solanum scuticum</i> Nee	Jurubeba-de-conserva	CNPH 419
<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill.	Lobeira	CNPH 247
<i>Solanum acanthodes</i> Hook	Jurubebão	CNPH 145
<i>Solanum acanthodes</i> Hook	Jurubebão	CNPH 151
<i>Solanum viarum</i> Dunal	Juá bravo miúdo	CNPH 185
<i>Solanum palinacanthum</i> Dunal	Juá bagudo	CNPH 174
<i>Solanum subinerme</i> Jacq.	Cajussara ou jurubeba do Norte	CNPH 127
<i>Solanum subinerme</i> Jacq.	Cajussara ou jurubeba do Norte	CNPH 202
<i>Solanum stramonifolium</i> Jacq.	Jurubeba juna ou vermelha	CNPH 119
<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.	Joá vermelho	CNPH 034
<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.	Joá vermelho	CNPH 362
<i>Solanum ciliatum</i> Lam.	Joá vermelho grande	CNPH 055
<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	Jurubeba grande ou cubiu	CNPH 196
<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	Jurubeba grande ou cubiu	CNPH 201
<i>Solanum macrocarpon</i> Linn.	Giboma	CNPH 445





**Figura 1.** Reações após inoculação mecânica com um isolado de groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) de acessos pertencentes a uma coleção de germoplasma de espécies de jurubebas (gênero *Solanum* subgênero *Leptostemonum*).

## **CAPÍTULO 7**

### **CONFIRMATION OF GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV) INFECTION IN EGGPLANT CULTIVARS IN BRAZIL**

**Publicado:** Plant Disease 107 (8): 2567, 2022.

(Publicado on-line <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-10-22-2349-PDN> )

**Confirmation of groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) infection in eggplant cultivars in Brazil**

T. S. Jorge, L. N. A. Reis, M. G. Fontes, F. F. Melo, F. M. B. Nery, and R. C. Pereira-Carvalho, Dept. Fitopatologia, UnB, Brasília–DF, Brazil. M. E. N. Fonseca, L. S. Boiteux, and M. F. Lima, Embrapa Vegetable Crops (CNPV), Brasília–DF, Brazil.

Eggplant (*Solanum melongena* L.) is an economically important vegetable crop in Brazil, especially in family-based farming. Eggplant hybrids ‘Ciça’ and ‘Napoli’ ( $\approx$  400 plants) were detected exhibiting virus-like symptoms (5-20% incidence) in field surveys (2015–2018) in Brasília–DF (Figure 1). Symptoms included chlorosis, mosaic, and apical leaf deformation. Six symptomatic leaf samples were collected from fruit-bearing plants (around 100 days after planting) aiming at verifying the potential orthotospovirus infection. Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was carried out with polyclonal antibodies (produced at Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças – CNPH) against the N gene coat protein of the three major orthotospoviruses: tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV), groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) and, tomato chlorotic spot orthotospovirus (TCSV). Strong serological reactions were observed only against GRSV antibodies in the extracts from symptomatic samples, but not in the controls. To confirm the causal agent of those symptoms, total RNA was extracted from infected leaf samples via the standard Trizol® (Sigma) protocol and subsequently used in a two-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT–PCR) approach. Synthesis of the cDNA was carried out with the J13 primer (5’–CCC GGA TCC AGA GCA AT–3’) (Cortez et al., 2001) followed by PCR assays with the

primer pair BR60 (5'-AGA GCA ATC GTG TCA-3') and BR65 (5'-ATC AAG CCT TCT GAA AGT CAT-3') (Eiraset al., 2002). This primer set amplifies a fragment of 453 bp including the 3' untranslated region at the 3' terminus of the S RNA and the protein N-coding gene of at least five species: TSWV, GRSV, TCSV, chrysanthemum stem necrosis orthospovirus (CSNV) and zucchini lethal chlorosis orthospovirus (ZLCV). In addition, GRSV-specific primers (LNA Reis, unpublished) were used for amplification of all three segments: L segment: LF/LR (5'-AAC AGG ATT CAG CAA TAT GG-3' / 5'-AAT TCC TTG AAG ACA ATT GTG T -3'); M segment: MF/MR (5'-TTT GTC CAA CCA TAC CAG ACC C- 3' / 5'-Page 1 of 3GGC TTC AAT AAA GGC TTG GG-3') and, S segment: SF/SR (5'-TTC AAA CTC AGT TGT ACT CTG A-3'/5'-TTA CTT TCG ATC TGG TTG AA- 3'). Amplicons with 509 bp (MT043204), 289 bp (MT043205), and 901 bp (MT043203) were obtained for L, M and S segments of the eggplant isolate DF-687. PCR amplicons corresponding to a segment of the N-coding gene (396 bp) of a second eggplant isolate (BJL02; MK176337) were obtained with the primer pair BR60/BR65 and subjected to Sanger dideoxy sequencing at CNPH. Alignments of nucleotide sequences of both isolates revealed identity levels varying around 99% to the corresponding genomic regions of a large set of GRSV isolates from GenBank database. PCR assays using total RNA as template yielded 494 bp amplicons solely with GRSV-specific primers (Webster et al., 2011), but no products were obtained with TSWV-specific primers (Adkins and Roskopf, 2002), confirming the former as the sole causal agent of the field symptoms. Leaves of eggplant cv. 'Çiça' and indicator hosts, including *Nicotiana rustica*, *Capsicum chinense* 'PI 159236' (with the *Tsw* gene), and *S. lycopersicum* cv. Santa Clara were rub inoculated with extracts prepared from eggplant samples naturally infected with GRSV. Mosaic, necrotic ringspots, and systemic leaf deformation symptoms were observed around ten days after inoculation on newly emerged leaves of all inoculated plants. GRSV infection was confirmed by DAS-ELISA and RT-PCR ten days after

inoculation. Eggplant was erroneously listed as a host of GRSV in Brazil (Kitajima, 2020). Hence, this is the first report of eggplant infection by this virus in South America. No significant yield losses have been observed in eggplant due to GRSV infection since the overall symptoms are often mild. However, this natural host of GRSV might impact disease management strategies since eggplant is quite often cultivated under family-based farming conditions as a companion crop of highly susceptible tomato, sweet-pepper, and lettuce cultivars.

### **References**

- Adkins, S., and Roskopf, E. N. 2002. *Plant Dis.* 86: 1310.
- Cortez, I., et al. 2001. *Arch. Virol.* 146:265.
- Eiras, M. et al. 2002. *Fitopatol. Bras.* 27:285.
- Kitajima, E.W. 2020. *Biota Neotrop.* 20: e2019932.
- Webster, C. G. et al. 2011. *Virology* 413: 216.

**Keywords:** etiology, pathogen detection, viruses, and viroids



**Figure 1** – Foliar symptoms induced by groundnut ringspot orthospovirus (GRSV) infection in eggplant (*Solanum melongena*) cv. ‘Ciça’, including concentric chlorotic and necrotic spots, mosaic, and leaf deformation.

## **CAPÍTULO 8**

### **NATURAL INFECTION OF *Cichorium intybus* (ASTERACEAE) BY GROUNDNUT RINGSPOT VIRUS (GENUS *ORTHOTOSPOVIRUS*) ISOLATES IN BRAZIL**

**Publicado:** Plant Disease 106:2005, 2022

**(Publicado on-line:** <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1184-PDN> )

**Natural infection of *Cichorium intybus* (Asteraceae) by groundnut ringspot virus (genus *Orthotospovirus*) isolates in Brazil**

T.S. Jorge<sup>1</sup>, M.G. Fontes<sup>1</sup>, M.F. Lima<sup>2</sup>, L.S. Boiteux<sup>2</sup>, M.E.N. Fonseca<sup>2</sup> and E.W. Kitajima<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Plant Pathology Department, University of Brasilia (UnB), Brasilia–DF, Brazil, <sup>2</sup>National Center for Vegetable Crops Research (CNPV), Embrapa Hortaliças, Brasilia–DF, Brazil, <sup>3</sup>LFN/ESALQ/USP, Piracicaba–SP, Brazil.

Plant Dis. 106:2005, 2022; published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1184-PDN>. Accepted for publication 17 December 2021.

Leaf chicory (*Cichorium intybus* L.) is a nutritionally rich vegetable used in regional cuisine in Brazil. Plants of *C. intybus* displaying symptoms (viz., chlorotic and necrotic ringspots, mosaic, and leaf deformation) similar to those induced by orthotospoviruses (genus *Orthotospovirus*, family *Tospoviridae*) were observed in three fields (approximately 0.2 ha each) in Gama County in the Federal District, Brazil, from September 2016 to January 2020 in plants of the cultivars ‘Folha-Larga’ and ‘Spadona’. Incidence of symptomatic plants was nearly 10% in each field. Transmission electron microscopic examination of thin sections from symptomatic leaf samples showed typical membrane-bounded orthotospovirus particles within cisternae of spongy parenchymal cells. Two individual leaf samples per field were collected and submitted to dot enzyme-linked immunosorbent assay with polyclonal anti-sera against the N protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), groundnut ringspot virus (GRSV), and tomato chlorotic spot virus (TCSV). Symptomatic samples strongly reacted only against GRSV antibodies. Total RNA was extracted (Trizol, Sigma) from all six samples and used as a template in RT-PCR assays. The primer J13 (59-CCC GGA TCC AGA GCA AT-39) was employed for cDNA synthesis using M-MLV reverse transcription. PCR assays were done with the primer pair BR60/BR65 (Eiras



et al. 2001) to obtain an approximately 500-bp fragment of untranslated region and partial N gene in the S RNA segment from each sample. Purified RT-PCR products of two randomly selected individual samples were directly sequenced (GenBankMW467981 and MZ126602) and their BLASTn analyses displayed 99 to 100% nucleotide identity to GRSV isolates previously reported infecting *C. endivia* in Brazil (Jorge et al. 2021). Our analyses combining N protein serology and N-gene sequencing (both directed to the S RNA segment) allowed us to confirm the GRSV infection of *C. intybus*, but the potentially reassortant nature of these isolates (Silva et al. 2019; Webster et al. 2015) is unknown since their M RNA segments were not characterized. Individual leaf extracts (in phosphate buffer, pH 7.0) of the sequenced isolates were mechanically inoculated onto 10 seedlings of two *C. intybus* cultivars ('Folha Larga' and 'Pao-de-Açucar') and three plants each of the indicator hosts *Capsicum chinense* PI 159236, *Nicandra physalodes*, *Nicotiana rustica*, *Datura stramonium*, and tomato cultivar 'Santa Clara'. Systemic chlorotic and necrotic ringspots, mosaic, and leaf deformation developed in the indicator hosts, and infection by GRSV was confirmed via serological assays 20 days after inoculation. However, no symptoms and no serological reaction to GRSV antibodies were observed on the *C. intybus* cultivars even after two successive mechanical inoculations. This transmission failure might be due to factors such as the requirement of the thrips vector(s), physicochemical barriers in the foliage, or the presence of non-mechanically transmissible helper agent(s) necessary to ensure GRSV infection of *C. intybus*. The natural infection of *C. Intybus* by a not fully characterized orthospovirus (mostly likely TSWV) has been observed since 1938 in Brazil (Kitajima 2020). Our report of GRSV infecting *C. intybus* thus confirms previous speculation that similar symptoms in this vegetable crop were induced by orthospovirus infection in Brazil.

## ***References***

- Eiras, M., et al. 2001. *Fitopatol. Bras.* 26:170.
- Jorge, T. S., et al. 2021. *Plant Dis.* 105:714.
- Kitajima, E. W. 2020. *Biota Neotrop.* 20:e20190932.
- Silva, J. M. F., et al. 2019. *Viruses* 11:187.
- Webster, C. G., et al. 2015. *Phytopathology* 105:388.

**Keywords:** etiology, pathogen detection, viruses, and viroids

## **CAPÍTULO 9**

### **FIRST REPORT OF *Cichorium endivia* (ASTERACEAE) AS A NATURAL HOST OF GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS IN BRAZIL**

**Publicado:** Plant Disease, 105(3): 714, 2021.

(Publicado on-line <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-07-20-1575-PDN> )

**First report of *Cichorium endivia* (Asteraceae) as a natural host of groundnut ringspot orthotospovirus in Brazil.**

T.S. Jorge<sup>1</sup>, M.F. Lima<sup>2</sup>, L.S. Boiteux<sup>2</sup>, M.E.N. Fonseca<sup>2</sup> and E.W. Kitajima<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Plant Pathology Department, University of Brasilia (UnB), Brasília–DF, Brazil, <sup>2</sup>National Center for Vegetable Crops Research (CNPV), Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, Brazil, <sup>3</sup>LFN/ESALQ/USP, Piracicaba–SP, Brazil.

Endive (*Cichorium endivia* L.) is a very important cash crop for small farmers in Brazil. During inspections conducted in the summer season of 2019 to 2020, leaf samples of *C. endivia* ‘La Spezia’ seedlings exhibiting typical symptoms of orthotospoviruses infection (namely, concentric chlorotic spots and apical leaf deformation; ≈10%) were collected in commercial greenhouses in Brasília–DF, Central Brazil. Leaves of one healthy and three symptomatic plants were initially evaluated via double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) with polyclonal antibodies (produced at the National Center for Vegetable Crops Research [CNPV]) raised against the nucleoprotein of the three major orthotospoviruses: tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV), groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV), and tomato chlorotic spot orthotospovirus (TCSV). Strong serological reactions were observed only against GRSV antibodies exclusively in extracts from symptomatic samples. To confirm the causal agent of those symptoms, total RNA was extracted (TRIzol; Sigma) from infected leaf samples and used in a two-step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) approach. Synthesis of the cDNA was carried out with the J13 primer (5’–CCC GGA TCC AGA GCA AT–3’) (Cortez et al. 2001) followed by PCR assays with the primer pair BR60 (5’–AGA GCA ATC GTG TCA–3’) and BR65 (5’–ATC AAG CCT TCT GAA AGT CAT–3’) (Eiras et al. 2001). This primer set amplifies a fragment of 453 bp including the untranslated

region at the 3' terminus of the small RNA and the protein N-coding gene of at least five orthotospoviruses: TSWV, GRSV, TCSV, chrysanthemum stem necrosis orthotospovirus, and zucchini lethal chlorosis orthotospovirus (Eiras et al. 2001). The obtained amplicons ( $\approx$  432 bp) were subsequently subjected to Sanger dideoxy nucleotide sequencing at CNPH. BLASTn analysis showed >99% identity with a wide array of GRSV isolates available in GenBank. The nucleotide sequence of Tospo #1 (MT215222) and Tospo #3 (MT215224) isolates displayed 100% identity between them, whereas the Tospo #2 (MT215223) isolate displayed one nonsynonymous point mutation in the 3' untranslated region in comparison with the former two isolates. Three plants of *C. endivia*, *Capsicum annuum* L. cv. Ikeda, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Santa Clara and its isoline 'LAM-147' (with the *Sw-5* resistance gene), *Nicotiana rustica* L., *Lactuca sativa* L. ('Vanda' and 'PI-342444'), and *Gomphrena globosa* L. were mechanically inoculated individually with each GRSV isolate in order to confirm their pathogenicity. Chlorotic lesions and mosaic were observed 7 days after inoculation of all plant materials, except the tomato inbred line LAM-147, which has the *Sw-5* gene that confers broad-spectrum resistance to all Brazilian orthotospoviruses (Boiteux and Giordano 1993). The GRSV infection was confirmed via DAS-ELISA and RT-PCR 15 days after inoculation, using the same set of antibodies and the primer pair BR60/BR65. Transmission electron microscopy of ultrathin sections from symptomatic leaf tissues, from both field-infected and experimentally inoculated endive, revealed the presence of typical orthotospovirus particles, within endoplasmic reticulum cisternae. Natural infection of endive by TSWV has been reported in Greece (Chatzivassiliou et al. 2000) and by TCSV in São Paulo State, Brazil, and in Florida, U.S.A. (Subramanya Sastry et al. 2019). To our knowledge, it is the first report of GRSV naturally infecting this Asteraceae species in Brazil. Confirmation of GRSV infection of *C. endivia* plants is a relevant piece of information aiming to design effective disease management strategies.

## ***References***

Boiteux, L. S., and Giordano, L. B. 1993. *Euphytica* 71:151.

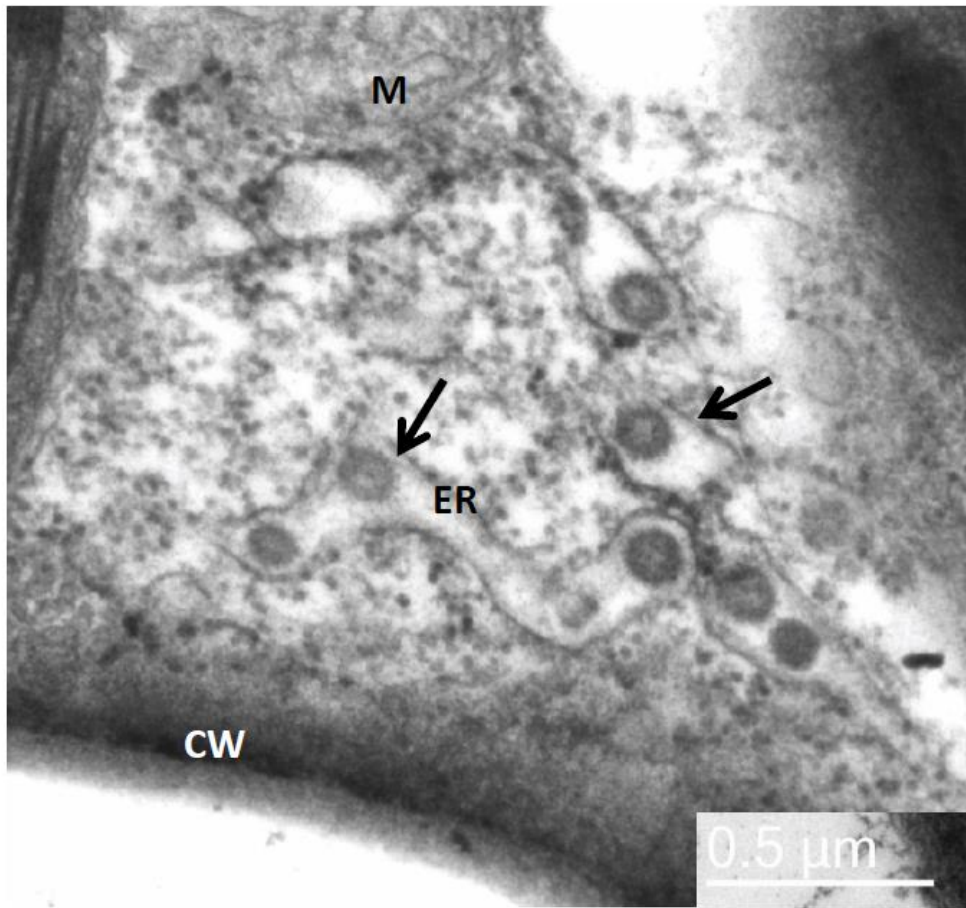
Chatzivassiliou, E. K., et al. 2000. *Ann. Appl. Biol.* 137:127.

Cortez, I., et al. 2001. *Arch. Virol.* 146:265.

Eiras, M., et al. 2001. *Fitopatol. Bras.* 26:170.

Subramanya Sastry, K., et al. 2019. *Encyclopedia of Plant Viruses and Viroids*. Springer, New Delhi, India.

**Keywords:** etiology, pathogen detection, viruses, and viroids



**Figure 1.** A spongy parenchyma cell of leaf tissue from *Cichorium endivia* infected by groundnut ringspot orthospovirus. Typical orthospovirus virions are present within cisternae of the endoplasmic reticulum (ER). CW= cell wall; M= mitochondrion.



**Figure 2.** Concentric chlorotic spots induced by groundnut ringspot orthospovirus (GRSV) infection in leaves of *Cichorium endivia* 'La Spezia'.



## **CONCLUSÕES GERAIS**

1. No **capítulo III** demonstramos pela primeira vez três acessos com tolerância a infecção por GRSV em condições naturais e em condições controlas de inoculação. Estes fatores podem ser incorporados em cultivares elite de alface, contribuindo assim para o desenvolvimento de variedades melhoradas. Esse germoplasma representa um avanço significativo na busca por estratégias de manejo da doença ‘vira-cabeça’ e na proteção das lavouras de alface em regiões neotropicais.
2. O estudo desenvolvido no **capítulo IV** representa o primeiro uso da técnica de RNA-seq para investigar a resposta da alface a um isolado de GRSV, sendo o principal membro do gênero *Orthospovirus* ocasionando perdas na cultura da alface. Os resultados obtidos têm o potencial de oferecer novas informações a cerca da interação entre a alface e o GRSV, identificando genes que são ativados ou desativados durante em interações compatíveis. Esse estudo não apenas amplia nosso entendimento sobre a interação entre a alface e o GRSV, mas também pode fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes, como a modificação genética direcionada a genes de suscetibilidade viral, que, por conseguinte, potencializam a obtenção de plantas resistentes. Portanto, os resultados deste estudo representam um avanço importante no campo da pesquisa sobre a resistência de plantas a orthospovirus, oferecendo perspectivas promissoras para o melhoramento genético da alface.
3. O **capítulo V** teve como objetivo introduzir o gene *Sw-5b* (que controla resistência a múltiplos orthospovirus no tomateiro) em plantas de alface da cultivar ‘Verônica’ por

meio de técnicas de engenharia genética. Apesar do sucesso na transferência do gene *Sw-5b*, não foram obtidas plantas de alface com resistência a GRSV. Tais resultados indicam a complexidade das interações presentes entre plantas e vírus, e ressalta a necessidade de seguir pesquisando e compreendendo os mecanismos subjacentes à resistência genética em diferentes culturas.

4. Nos capítulos **VI, VII, VIII & IX** foram identificadas novas espécies hospedeiras de naturais ou experimentais de GRSV.
5. Três culturas (duas Asteraceae e uma Solanaceae) foram relatadas como novas hospedeiras naturais de GRSV, incluindo a chicória (*Cichorium endivia*), o almeirão (*Cichorium intybus*) e a berinjela (*Solanum melongena*).
6. Trinta acessos do banco ativo de jurubebas do gênero *Solanum* subgênero *Leptostemonum* foram desafiados com GRSV visando detectar fontes de resistência e identificar novas hospedeiras experimentais. Todos os acessos se mostraram suscetíveis, com apenas três acessos apresentando níveis mais elados de plantas não sintomáticas. Foram relatadas como novas hospedeiras experimentais de GRSV acessos de *Solanum macrocarpon*, *S. acanthodes*, *S. viarum*, *S. subinerme*, e *S. sisymbriifolium*. O reconhecimento destas espécies semi-perenes como hospedeiras virais possibilita o delineamento de medidas adequadas de controle, podendo citar a remoção destas plantas quando vizinhas a plantios comerciais de culturas suscetíveis a GRSV.
7. Desta forma, a presente tese fornece novas informações que poderão auxiliar no estabelecimento de estratégias mais eficazes de melhoramento genético e de manejo de doenças induzidas por orthotospovirus em alface bem como em outras plantas hospedeiras.