

MARCELO OLIVEIRA SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DOS GENES eIF4E E eIF(iso)4E EM *Solanum habrochaites* f. *glabratum* E INTROGRESSÃO DO ALELO DE RESISTÊNCIA AO PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*) EM TOMATEIRO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2012

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

T

S676i  
2012

Soares, Marcelo Oliveira, 1980-  
Identificação dos genes eIF4E e eIF(iso)4E em  
*Solanum habrochaites* f. *grabratum* e introgressão do alelo  
de resistência ao Pep YMV (*Pepper yellow mosaic virus*) em  
tomateiro / Marcelo Oliveira Soares. – Viçosa, MG, 2012.  
vii, 39f. : il. ; 29cm.

Orientador: Derly José Henrique da Silva  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 34-39

1. Tomate - Melhoramento genético. 2. Vírus de plantas.  
3. *Pepper yellow mosaic virus*. 4. Genes. 5. Tomate -  
Resistência a doenças e pragas - Aspectos  
genéticos. 6. *Solanum habrochaites* f. *grabratum*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 635.6422

MARCELO OLIVEIRA SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DOS GENES eIF4E E eIF(iso)4E EM *Solanum habrochaites* f. *glabratum* E INTROGRESSÃO DO ALELO DE RESISTÊNCIA AO PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*) EM TOMATEIRO**

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

APROVADA: 25 de julho de 2012.

---

Carlos Nick Gomes

---

Francisco Murilo Zerbini Júnior  
(Coorientador)

---

Moacil Alves de Souza

---

Glória Patrícia Castillo Urquiza

---

Derly José Henriques da Silva  
(Orientador)

*A Deus, pelo dom da vida.*

*A Érica, pelo carinho e amor constantes.*

*Aos meus pais, Sebastião e Ligia, pela educação e dedicação oferecidas ao longo de toda minha vida.*

*Aos meus irmãos, Bruno e Gustavo, pela convivência alegre de sempre.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Fito-tecnia, pela oportunidade de realização da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e pela liberação de recursos financeiros para a realização do projeto.

Ao prof. Derly José Henriques da Silva, pela confiança constante depositada em meu trabalho e pela amizade.

Ao prof. Cosme Damião Cruz, pela colaboração para que este trabalho fosse realizado.

Ao prof. Francisco Murilo Zerbini Junior, pelo apoio oferecido para o desenvolvimento deste trabalho.

À pesquisadora Ana Cristina Pinto Juhász, pela amizade e oportunidade de continuar seu projeto.

Ao Dr. Carlos Nick, pelo compartilhamento de conhecimentos relacionados à condução deste trabalho.

Ao prof. Moacil Alves de Souza, pelas contribuições dadas na minha formação.

Aos pesquisadores Dr. Fábio Nascimento da Silva e Dr<sup>a</sup> Glória Patrícia Castillo Uquiza, pela amizade e pelos ensinamentos cotidianos oferecidos na rotina do laboratório.

Aos amigos, Larissa e César, pelas contribuições para finalização deste trabalho.

Aos meus amigos do Núcleo de Estudos de Olerícolas, Victor, Mateus, Bruno Laurindo, Bruno Marin, Adilson, Carlos Nick, Renata, Norma, Fábio, Izaias, Mariana, Josi, Wilson e Zé Nilson, pelo auxílio na coleta de dados e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, Larissa, César, Glória, Roberto, Marcos, Márcio, Pedro, Fernanda, Ana Angélica, Silvia, Adriana, Fábio, Alisson, Poli, Daniel, Marcos e Sr Joaquim, pela convivência durante a condução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioinformática, Caio, Dani, Rafael, Otávio, Gustavo e Loreta.

Enfim, a todos que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho, o meu real e sincero agradecimento.

## **BIOGRAFIA**

MARCELO OLIVEIRA SOARES, filho de Sebastião Corrêa Soares e Lígia Maria Fiscina Oliveira Soares, nasceu em 5 de dezembro de 1980, em Viçosa, Minas Gerais. É casado com Erica Beranger Silva Soares.

Em 6 de outubro de 2006, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Em 14 de outubro de 2006, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em julho de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o Programa de Doutorado em Genética e Melhoramento, em nível de doutorado, pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese em 25 de julho de 2012, sob a orientação do prof. Dr. Derly José Henriques da Silva.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2.1 Doenças virais do tomateiro no Brasil.....	4
2.2 Características dos potyvírus .....	4
2.3 Mecanismos de resistência a potyvírus.....	8
2.4 Resistência dominante e recessiva.....	9
2.5 Durabilidade da resistência genética.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1 Retrocruzamentos para introgressão do gene de resistência ao PepYMV em linhagens de tomate .....	14
3.2 Avaliação do espectro de ação da resistência do acesso BGH6902 a potyvírus ..	15
3.3 Amplificação da região codificadora do eIF4E e eIF(iso)4E .....	15
3.4 Clonagem e sequenciamento dos fragmentos amplificados .....	16
3.5 Análise filogenética .....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5. CONCLUSÕES .....	33
LITERATURA CITADA .....	34

## RESUMO

SOARES, Marcelo Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Identificação dos genes eIF4E e eIF(iso)4E em *Solanum habrochaites f. glabratum* e introgressão do alelo de resistência ao PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*) em tomateiro.** Orientador: Derly Jose Henriques da Silva. Coorientadores: Francisco Murilo Zerbini Junior e Everaldo Gonçalves de Barros.

A incidência do potyvírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) constitui grande problema na produção de tomate no Brasil, sendo necessário o plantio de cultivares resistentes visando a diminuição das perdas relativas a este patógeno. A utilização de genes de resistência presentes em acessos armazenados em banco de germoplasma é essencial para obtenção de cultivares resistentes. Mediante estudos, é possível identificar mutações naturais no fator de iniciação da tradução eucarióticos eIF4E e eIF(iso)4E, que levam à resistência recessiva ao vírus, por meio da redução ou mesmo da ausência da multiplicação viral. Os objetivos deste trabalho foram: i) identificar os alelos eIF4E e eIF(iso)4E encontrados no acesso de tomate silvestre (*Solanum habrochaites f. glabratum*) BGH6902, resistente ao PepYMV e na cultivar suscetível Santa Clara; e ii) transferir o alelo que confere resistência para linhagens de tomateiro. Para isso, cDNAs correspondentes aos alelos do eIF4E e o eIF(iso)4E do acesso BGH6902 e da cultivar Santa Clara foram clonados e sequenciados. Paralelamente, foram realizados retrocruzamento e seleção de progênies com resistência genética. Foram selecionadas progênies com baixa concentração viral, como RC2-123-4 e RC2-98-2. Na comparação das sequências de aminoácidos do eIF4E e eIF(iso)4E, ambos amplificados de BGH6902 e Santa Clara, foram indicadas quatro substituições não sinônimas para eIF4E (P69S, L85V, K123Q e N224S) e quatro para eIF(iso)4E (V46A, H56Y, V78L e V175I).

## ABSTRACT

SOARES, Marcelo Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Identification of genes eIF4E and eIF(iso)4E in *Solanum habrochaites f. glabratum* and introgression of resistance allele PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*) in tomato.** Adviser: Derly Jose Henriques da Silva. Co-advisers: Francisco Murilo Zerbini Junior and Everaldo Gonçalves de Barros.

The incidence of the potyvirus Pepper yellow mosaic virus is a major problem in tomato production in Brazil, requiring the planting of resistant cultivars in order to minimize losses related to this biotic stress. The use of resistance genes present in access stored in genebank is essential for obtaining resistant cultivars. Through studies, and can identify natural mutations in the factor of eukaryotic translation initiation eIF4E and eIF(iso)4E carrying recessive resistance to the virus through the reduction or even absence of viral replication. Our objectives were (i) to identify the alleles eIF4E and eIF(iso)4E access found in wild tomato (*Solanum habrochaites f. Glabratum*) BGH6902 PepYMV resistant and susceptible cultivar Santa Clara, and (ii) transfer the allele that confers resistance to strains of tomato. For this, cDNAs corresponding to the alleles of eIF4E and eIF(iso)4E access BGH6902 and Santa Clara were cloned and sequenced, along with the realization of backcrossing and selection of progenies from this cross contrasting genetic resistance. Progeny were selected with a low virus concentration, such as RC2-123-4 and RC2-98-2 was identified in which high level of impact resistance of PepYMV. In comparing the amino acid sequences of eIF4E and eIF(iso)4E, both amplified and BGH6902 Santa Clara, were given four non-synonymous substitutions for eIF4E (P69S, V85L, K123Q, and N224S) and four for eIF(iso)4e (V46A , H56Y, V78L and V175I).

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um grande produtor de tomate; entretanto, o cultivo do tomateiro em regiões tropicais e subtropicais é afetado por inúmeras doenças, pragas e estresses abióticos, provocando expressivas perdas no rendimento e na depreciação da qualidade dos frutos. As doenças são os principais fatores limitantes do cultivo, principalmente quando não há cultivares resistentes disponíveis (DO VALE; JUNIOR, 2007).

O gênero *Potyvirus* constitui um dos grupos mais numerosos de vírus de plantas, contendo, aproximadamente, 20 % das espécies descritas. As espécies virais classificadas nesse gênero são capazes de infectar mais de 2.000 espécies de plantas (FAUQUET *et al.*, 2005).

Os *potyvirus* possuem partículas alongadas e flexuosas e genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, de sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA viral possui uma proteína de origem viral denominada VPg, ligada covalentemente à extremidade 5' e uma cauda poli A, localizada na extremidade 3', sendo envolto por aproximadamente 2.200 cópias de uma proteína capsidial com massa molecular em torno de 34 kDa (BERGER *et al.*, 2005).

Inoue-Nagata *et al.* (2002) relataram a ocorrência de um novo potyvírus causando mosaico-amarelo em pimentão-doce no sul do Brasil, denominado *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Dois anos após a descoberta dessa virose, Maciel-Zambolim e Costa (2004) relataram a ocorrência do PepYMV causando perdas de 40 a 100 % na cultura do tomateiro no estado do Espírito Santo, o que foi atribuído à elevada quantidade de afídeos-vetores presentes em plantas daninhas não controladas durante o manejo da cultura; à realização de plantios escalonados de tomate em áreas de cultivo vizinhas e concentradas em uma mesma época; e ao plantio de híbridos suscetíveis.

De fato, a incidência do PepYMV na cultura do tomateiro vem aumentando nos últimos anos, demonstrando a necessidade de busca de alternativas visando diminuir as perdas causadas por esse vírus. Palazzo e Bergmann, (2004) relataram incidência de até 50 % de plantas com sintomas nos municípios de Guapiara e Apiaí, SP. Em um levantamento realizado em campos de produção do Distrito Federal, 85,2 % de 54 amostras coletadas estavam infectadas pelo PepYMV (DIANESE *et al.*, 2008).

O uso da resistência genética é uma alternativa para diminuir os prejuízos causados por doenças causadas pelos vírus (JANZAC *et al.*, 2009a), por produzir proteção efetiva sem implicações adicionais de custos para o produtor, além de não

exigir mudanças tecnológicas no sistema de produção e ser ambientalmente correto e mais seguro para o consumidor.

De acordo com o mecanismo de ação da resistência, esta é classificada como dominante ou recessiva. Em solanáceas, segundo Kyle e Palloix, (1997), entre os 16 genes de resistência de efeito maior contra potyvírus, oito são recessivos; em pimentão, no mínimo, sete são de efeito maior, denominados genes *pvr* (*potyvirus resistance*). Vários desses genes, dominantes ou recessivos, já foram descritos e introduzidos em cultivares comerciais (PROVVIDENTI; HAMPTON, 1992). Entre esses, o gene *Pvr4*, dominante e obtido do germoplasma de pimentão *C. annuum* Serano Criollo de Morelos 334 (CM334), foi inserido em muitos híbridos de pimentão na década de 1990, conferindo resistência eficiente contra todos os isolados dos potyvírus *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PepMoV) e *Ecuadorian rocoto virus* (ERV). Gioria *et al.* (2009) relataram a presença do PepYMV em plantas de pimentão ‘Magali R’ (*Pvr4/Pvr4*), um híbrido caracterizado como resistente ao vírus, em campos de produção localizados na cidade de Lins, SP, demonstrando assim a ocorrência da quebra de resistência genética.

Para representar a variabilidade genética do PepYMV foi proposta a utilização da nomenclatura  $2^x$ , em que x é o número de alelos específicos do gene *pvr2* (*potyvirus resistance 2*) suprimidos e o número 4 para a capacidade de quebrar a resistência do gene *Pvr4* do cultivar Criollo de Morelos 334 (CM334). Assim, usando este critério, pode-se classificar o PepYMV em cinco patótipos:  $2^1.2^2$ ;  $2^1.2^3$ ;  $2^1.2^2.2^3$ ;  $2^1.2^3.4$  e  $2^1.2^2.2^3.4$  (MOURA; MITUTI, 2011)

Ruffel *et al.* (2002) relataram que o gene resistência recessivo *pvr2* de pimentão corresponde ao fator de iniciação da tradução 4E (eIF4E). O eIF4E ou sua isoforma, o eIF(iso)4E, foram demonstrados consistirem em genes de resistência recessivos a potyvírus em diversas culturas, incluindo a alface (gene *mol<sup>1</sup>*, resistência ao *Lettuce mosaic virus*, LMV) (NICAISE *et al.*, 2003); a ervilha (gene *sbm1*, resistência ao *Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) (GAO *et al.*, 2004); e o tomateiro (gene *pot1*, resistência ao PVY) (RUFFEL *et al.*, 2005).

Segundo Nicaise *et al.* (2003), a resistência mediada pelo eIF4E/eIF(iso)4E impede a multiplicação viral em nível celular. Em alguns casos, entretanto, o acúmulo sistêmico de partículas virais ocorre em menor extensão e sem sintomas aparentes. A observação-chave na elucidação da natureza molecular da resistência recessiva foi a conclusão da participação da proteína viral (VPg) ou de sua precursora, a proteína NIa, ligando-se ao eIF4E ou a sua isoforma em ensaios de duplo-híbrido em levedura e em

ensaios de ligação *in vitro* (WITTMANN *et al.*, 1997; LÉONARD *et al.*, 2000). A função dessa interação no ciclo de infecção viral é suportada por relatos que mutações na VPg que impedem a interação com o eIFiso4E *in vitro* também impedem a infecção viral na planta (LÉONARD *et al.*, 2000). Esse resultado também foi relatado por Parrella *et al.* (2002) estudando a interação PVY em pimentão.

Mesmo que esses genes controlem diversos fenótipos de resistência, como, por exemplo, a completa restrição do acúmulo viral, o acúmulo viral reduzido ou a restrição do movimento célula-a-célula, em todos os casos a resistência é oriunda de pequenas mudanças nas proteínas eIF4E codificadas pelos alelos de resistência.

Trabalhos realizados por Juhasz *et al.* (2006) e Juhasz *et al.* (2008) identificaram uma fonte de resistência genética ao PepYMV em um acesso *Solanum habrochaites* f. *glabratum* denominado BGH-6902. O padrão de herança deste gene de resistência ao PepYMV foi determinado como monogênico recessivo. Supõe-se, portanto, que esse gene consiste em um alelo do eIF4E ou eIF(iso)4E.

O objetivo deste trabalho foi identificar os alelos dos genes eIF4E e eIF(iso)4E do acesso silvestre de tomate BGH6902, com posterior introgressão, por meio de retrocruzamentos de genes de resistência ao PepYMV em linhagens de tomateiro pertencentes ao Programa de Melhoramento de Tomate da Universidade Federal de Viçosa.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doenças virais do tomateiro no Brasil

No Brasil, a cultura do tomateiro figura entre as hortaliças mais importantes, sendo seu cultivo uma atividade significativa para o setor agrícola, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Entretanto, esta cultura, nas regiões tropicais e subtropicais, é afetada por inúmeras doenças, pragas e estresses abióticos, provocando expressivas perdas de rendimento e depreciação da qualidade dos frutos. As doenças são os principais fatores limitantes do cultivo, principalmente quando não há cultivares resistentes disponíveis (DO VALE; JUNIOR, 2007).

Na cultura do tomateiro, além do prejuízo causado por vírus do gênero *Potyvirus*, como o PVY e o PepYMV, há também prejuízo econômico com viroses do gênero *Begomovirus*, transmitidos por mosca-branca e dos tospovírus, que causam a doença conhecida como vira-cabeça (ZERBINI; GUIMARÃES, 2007).

Um novo potyvírus foi relatado por Inoue-Nagata *et al.* (2002) causando mosaico-amarelo em pimentão no sul do Brasil, denominado *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Dois anos após a descoberta dessa virose, Maciel-Zambolim e Costa (2004) relataram a ocorrência do PepYMV causando perdas econômicas na cultura do tomateiro no estado do Espírito Santo, demonstrando a necessidade de busca de alternativas visando diminuir as perdas causadas por esse vírus.

De fato, a incidência do PepYMV na cultura do tomateiro vem aumentando nos últimos anos. Palazzo e Bergmann (2004) relataram incidência de até 50 % de plantas com sintomas nos municípios de Guapiara e Apiaí, SP. Ávila e Inoue-Nagata (2004) relataram perdas de 40 a 100 % em lavouras no estado do Espírito Santo, o que foi atribuído à elevada quantidade de afídeos-vetores presentes em plantas daninhas não controladas durante o manejo da cultura; à realização de plantios escalonados de tomate em áreas de cultivo vizinhas e concentradas em uma mesma época; e ao plantio de híbridos suscetíveis.

### 2.2 Características dos potyvírus

O gênero *Potyvirus* constitui um dos gêneros mais numerosos de vírus de plantas, contendo, aproximadamente 20 % das espécies descritas. As espécies virais

classificadas nesse gênero são capazes de infectar mais de 2.000 espécies de plantas (FAUQUET *et al.*, 2005). Todos os potyvírus formam corpos de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas “cata-ventos”, sendo esta uma característica relevante para identificação de espécies pertencentes à família. Membros dessa família são facilmente transmitidos experimentalmente de plantas infectadas para plantas saudáveis, pela inoculação via extrato vegetal tamponado ou utilizando preparações virais purificadas ou concentradas (BERGER *et al.*, 2005).

Os potyvírus possuem partículas alongadas e flexuosas e genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, de sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA viral possui uma proteína de origem viral denominada VPg, ligada covalentemente à extremidade 5’, e uma cauda poli-A localizada na extremidade 3’, sendo envolto por aproximadamente 2.200 cópias de uma proteína capsidial com massa molecular em torno de 34 kDa (BERGER *et al.*, 2005).

A proteína capsidial dos potyvírus apresenta uma região aminoterminal altamente variável em tamanho e sequência, uma região central altamente conservada, contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxiterminal com 18-20 aminoácidos. As regiões amino e carboxiterminal estão voltadas para o exterior da partícula viral e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, conseqüentemente, da partícula viral (SHUKLA *et al.*, 1991). O genoma dos potyvírus possui uma fase de leitura principal que dá origem a uma poliproteína com massa molecular superior a 350 kDa e uma segunda fase de leitura sobreposta à ORF principal na região correspondente da poliproteína que codifica a proteína P3. Essa segunda ORF, denominada PIPO (*pretty interesting potyvirus* ORF), codifica uma proteína com aproximadamente 25 kDa, que se acumula próximo aos plasmodesmas e, portanto, pode estar associada ao movimento célula-a-célula do vírus (CHUNG *et al.*, 2008).

Em relação à poliproteína, pelo menos dez proteínas (P1, HC-Pro, P3, 6K<sub>1</sub>, CI, 6K<sub>2</sub>, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb, CP) são produzidas por autoproteólise. A principal consequência desse mecanismo de expressão gênica é que todas as proteínas virais derivadas da poliproteína são produzidas em quantidades estequiométricas, independentemente da necessidade do vírus para cada proteína em particular. As proteínas produzidas em excesso acumulam-se na célula infectada na forma de inclusões. Essa estratégia de replicação e expressão gênica é bastante danosa para a célula, implicando em um grande dreno de metabólitos, o que se reflete em sintomas severos na planta infectada (ZERBINI; ZAMBOLIM, 1999).

As proteínas produzidas pelos potyvírus apresentam caráter multifuncional, uma vez que quase todas as proteínas de função conhecida atuam em mais de um processo do ciclo de infecção. As proteínas CI, NIB, NIa-VPg e 6K<sub>2</sub> estão relacionadas à replicação viral. A proteína CI possui atividades de helicase, ATPase e ligação à RNA (LAÍN *et al.*, 1991). A proteína NIB é a RNA polimerase dependente de RNA e possui a sequência de aminoácidos Gln-Asp-Asp característica das RdRp virais (HONG; HUNT, 1996). O processo de replicação ocorre em associação com membranas do retículo endoplasmático das células infectadas (SCHAAD *et al.*, 1997). A proteína 6K<sub>2</sub> tem como função manter o complexo replicativo ancorado na membrana plasmática do hospedeiro. Como o sítio de clivagem entre 6K<sub>2</sub> e NIa possui baixa afinidade pela protease, essas proteínas permanecem como único polipeptídeo por um tempo relativamente longo, ancoradas ao retículo endoplasmático (RESTREPO-HARTWIG; CARRINGTON, 1992).

As proteínas P1, HC-Pro e NIa-Pro são proteases virais. A NIa-Pro é responsável pela clivagem de todos os sítios da poliproteína, com exceção das clivagens entre P1/HC-Pro e HC-Pro/P3, que são realizadas pelas proteases P1 e HC-Pro, respectivamente (DOUGHERTY; PARKS, 1991).

A protease NIa, que atua em *cis* e *trans*, é do tipo cisteína e todos os cinco sítios de clivagens apresentam a sequência conservada Glu-X-X-Tyr-X-Gln/Ser,Gly, Ala e Val com o sítio de clivagem localizado após o resíduo de glutamina. As posições X são ocupadas por aminoácidos neutros ou hidrofóbicos (CARRINGTON; DOUGHERTY, 1988; DOUGHERTY *et al.*, 1988). Por se tratar de uma sequência degenerada, as clivagens das diferentes regiões são processadas com eficiências distintas, dependendo do contexto de aminoácidos da sequência, e esta regulação é essencial para a replicação viral (SCHAAD *et al.*, 1996).

O sítio de clivagem localizado entre as porções VPg e Pro da própria NIa é processado de maneira imperfeita, pois não possui a sequência ideal de reconhecimento. A sequência neste sítio para o TEV é Glu-Asp-Leu-Thr-Phe-Glu/Gly, o que prejudica o reconhecimento da sequência. É interessante notar, entretanto, que mutações que aceleram a clivagem deste sítio são prejudiciais à replicação do genoma viral (SCHAAD *et al.*, 1996).

Ao contrário da maioria dos outros vírus de plantas já estudados, os potyvírus não possuem proteína com função exclusiva no movimento célula-a-célula. Diversas proteínas dos potyvírus já foram implicadas no movimento célula-a-célula, incluindo

CP, HC-Pro, CI e PIPO. Evidências genéticas demonstram que a função da CP do TEV no movimento célula-a-célula é independente da formação de vírions (DOLJA *et al.*, 1994). Mutantes na região central da CP do TEV não foram capazes de se movimentar célula-a-célula, e deleções na região aminoterminal da CP também implicaram em redução do movimento, sugerindo que esta região atua de forma acessória (DOLJA *et al.*, 1994; 1995).

O envolvimento da proteína HC-Pro no movimento foi demonstrado por meio de ensaios genéticos e de microinjeção. Mutações na HC-Pro do TEV reduziram o movimento célula-a-célula quando comparado ao vírus selvagem (CRONIN *et al.*, 1995; KASSCHAU *et al.*, 1997), indicando possível envolvimento da proteína como fator acessório ao movimento. Estudos de microinjeção de proteínas dos potyvírus *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) e *Lettuce mosaic virus* (LMV), expressas em *Escherichia coli*, demonstraram a capacidade das proteínas CP e HC-Pro de se movimentarem célula-a-célula, aumentarem o limite de exclusão dos plasmodesmas e facilitarem o movimento de RNA viral. Mutações na região central da CP e na região carboxiterminal de HC-Pro aboliram a capacidade de movimentação célula-a-célula destas proteínas. Os experimentos indicaram interação entre CP, HC-Pro e os plasmodesmas, sugerindo que os potyvírus codificam duas proteínas com características de proteínas de movimento (ROJAS *et al.*, 1997). A proteína CI não foi capaz de aumentar o limite de exclusão dos plasmodesmas (ROJAS *et al.*, 1997); entretanto, diversos trabalhos mostraram seu envolvimento no movimento viral (RODRÍGUEZ-CEREZO *et al.*, 1997; CARRINGTON *et al.*, 1998).

Análises ultraestruturais de folhas de tabaco cinco dias após inoculação com o TVMV revelaram a colocalização das proteínas CI e CP próximas ou sobre a abertura dos plasmodesmas (RODRÍGUEZ-CEREZO *et al.*, 1997). Além disso, foram realizadas mutações na região aminoterminal da proteína CI do TEV e indivíduos carregando essas mutações apresentaram níveis de replicação equivalentes ao vírus selvagem; entretanto não foram capazes de se movimentar célula-a-célula (CARRINGTON; WHITHAM, 1998).

Recentemente, foi demonstrado que a proteína PIPO é essencial ao movimento célula-a-célula do *Soybean mosaic virus* (SMV). Clones infecciosos de SMV com mutações que geram códons de terminação prematuros na região codificadora da ORF PIPO, mas que não alteram a sequência da poliproteína, apresentaram taxas normais de replicação do genoma viral. Porém, a infecção ficou confinada às células inicialmente

infectadas. O movimento viral não foi restaurado mesmo quando o vírus mutante e o tipo selvagem foram inoculados simultânea ou sequencialmente (WEN; HAJIMORAD, 2010). Além disso, foi demonstrado que a localização de CI nos plasmodesmas em células de *Nicotiana benthamiana* é modulada por P3N-PIPO, e que esta proteína se localiza nos plasmodesmas e interage fisicamente com CI (WEI *et al.*, 2010).

Uma vez estabelecida a infecção sistêmica, a transmissão dos potyvírus de uma planta para outra pode ser feita por inúmeras espécies de afídeos, de forma não persistente estiletar, na qual o vírus fica restrito ao aparelho bucal do inseto. Desta forma, a utilização do controle químico torna-se ineficaz, uma vez que, sob a ação de diversos inseticidas, os insetos praticam inúmeras picadas de prova e com isto inoculam o vírus com maior eficiência (BERGER *et al.*, 2005).

### **2.3 Mecanismos de resistência a potyvírus**

Pesquisas visando encontrar genes de interesse podem ser usadas para identificar e caracterizar *loci* de resistência a diversas doenças, sendo que já foram isolados e caracterizados numerosos genes de reconhecimento e defesa a patógenos, denominados genes R. Esses genes foram classificados em três grupos, com base na presença de domínios funcionais: NBS (*nucleotide binding site*); LRR (*leucine-rich repeat*), relacionado às interações proteína-proteína); e quinase, relacionado à transdução de sinal intracelular (BENT, 1996).

No caso da interação potyvírus-hospedeiro, estudos realizados por Ruffel *et al.* (2002) demonstraram que ocorre interação entre o fator de iniciação da tradução eIF4E e sua isoforma, eIF(iso)4E, com a proteína viral VPg. Por meio do sistema duplo-híbrido de levedura, foi demonstrada interação da proteína precursora VPg-Pro do TEV com os fatores de iniciação de tradução eucarióticos eIF4E e eIF(iso)4E (SCHAAD *et al.*, 2000). Posteriormente, confirmou-se que o gene *pvr2* (*potyvirus resistance 2*), presente em plantas de pimentão e que confere resistência contra algumas estirpes de PVY, codifica o fator eIF4E, por meio da análise de segregação dos alelos de *pvr2* e uma isoforma do eIF4E, levando ao estado de incompatibilidade entre VPg e eIF4E em genótipos resistentes, como relatado por Ruffel *et al.* (2002). O gene *pvr2* foi isolado e caracterizado, mostrando identidade elevada com os eIF4E de *A. thaliana* e arroz (RUFFEL *et al.*, 2004). Em trabalho semelhante, identificou-se o gene *lsp1* (*loss-of-*

*susceptibility to potyviruses 1*) em mutantes de *A. thaliana* como o eIF(iso)4E, conferindo resistência aos isolados de TuMV e TEV (LELLIS *et al.*, 2002).

A análise genética de 19 cultivares de alface em relação à infecção por diferentes isolados do LMV revelou correlação perfeita entre três isoformas do eIF4E e os genes recessivos *mol<sup>1</sup>* e *mol<sup>2</sup>*. Ambos, eIF4E e *mol<sup>1</sup>*, cossegregaram na progênie obtida a partir de cruzamentos entre genótipos suscetíveis com genótipos contendo o gene *mol<sup>1</sup>*, resultado confirmado pela expressão ectópica do eIF4E (NICAISE *et al.*, 2003).

Possíveis funções da interação entre o eIF4E e a VPg no ciclo de infecção dos potyvírus foram propostas por Lellis *et al.* (2002). A primeira delas tem relação com a iniciação da tradução do RNA viral, em que o eIF4E reconheceria a VPg e esse reconhecimento iniciaria o processo de montagem do complexo de tradução. A segunda estaria relacionada com a estabilidade do genoma, em que a interação eIF4E-VPg protegeria o RNA viral da enzima DCP1, bloqueando a degradação do genoma viral pelas exonucleases tipo XRN codificadas pelo hospedeiro. A terceira função se relaciona com o tráfego intracelular, em que o eIF4E interage com o eIF4G, uma proteína com atividade de ligação aos microtúbulos, de forma que a interação eIF4E-VPg poderia engajar o genoma viral com o maquinário de tráfego intracelular.

O modelo atualmente proposto para a interação entre a VPg e o eIF4E sugere que a VPg teria função análoga ao “cap” encontrado em mRNAs de eucariotos, sendo reconhecida pelo eIF4E, de forma a tornar possível a tradução do genoma viral (RUFFEL *et al.*, 2005). Entretanto, essa hipótese ainda não foi comprovada experimentalmente.

German-Retana *et al.* (2008) demonstraram que mutação natural do eIF4E/eIF(iso)4E leva a resistência recessiva ao vírus. Além disso, o eIF4E, ou sua isoforma, tem função na infecção e acumulação, não somente para potyvírus, mas, também, para vírus pertencentes aos gêneros *Cucumovirus* (YOSHII *et al.*, 2004) e *Bymovirus* (STEIN *et al.*, 2005). Não somente a família gênica eIF4E foi observada estar relacionada com a resistência, mas, também, os fatores eIF4G/eIF(iso)4G estão envolvidos na interação vírus-hospedeiro (ALBAR *et al.*, 2006).

## **2.4 Resistência dominante e recessiva**

O uso de resistência genética representa o método mais eficiente para minimizar as culturas dos prejuízos causados pelos vírus (JANZAC *et al.*, 2009b). De acordo com

o mecanismo de ação para restringir a replicação ou mesmo o movimento viral, a resistência é classificada como recessiva ou dominante.

Na maioria dos casos, a resistência dominante segue o modelo de interação gene-a-gene, havendo interação direta ou indireta entre o fator de resistência da planta e o fator de virulência viral. A resistência propriamente dita está relacionada com o desencadeamento de resposta de hipersensibilidade no hospedeiro. A maioria dos genes de resistência a vírus com herança dominante pertence à classe NBS-LRR (MAULE *et al.*, 2007).

Ao contrário da resistência dominante, a recessiva normalmente envolve mutações ou perdas de um ou mais componentes do hospedeiro, cuja atividade é essencial em determinado ponto do ciclo de infecção do vírus (DIAZ-PENDON *et al.*, 2004).

Em Solanaceae, segundo Kyle e Palloix (1997), entre os 16 genes de resistência de efeito maior contra potyvírus, oito são recessivos. Em pimentão, no mínimo sete são de efeito maior, denominados genes *pvr* (*potyvirus resistance*). Vários desses genes, dominantes ou recessivos, já foram descritos e introduzidos em cultivares comerciais (PROVVIDENTI; HAMPTON, 1992). Entre esses, o gene *Pvr4*, dominante e obtido do germoplasma Criollo de Morelos 334 (CM334), foi introgridido em muitos híbridos de pimentão-doce na década de 1990, conferindo resistência eficiente contra todos os isolados do PVY, *Pepper mottle virus* (PepMoV) e *Ecuadorian rocoto virus* (ERV). Entretanto, há mais genes de resistência contra potyvírus recessivos do que dominantes, conforme descrito por Diaz-Pendon *et al.* (2004), que descrevem os genes recessivos *pvr1*, *pvr2*, *pvr3*, *pvr5* e *pvr6*.

Embora essas resistências recessivas possam ser qualitativas, em alguns casos são quantitativas ou componentes de resistência poligênica. Por exemplo, em pimentão, um alelo de resistência eIF4E no locus *pvr2*, que controla resistência parcial para os patótipos 0, 1 e 2 do PVY, foi mapeado por Caranta *et al.* (1997), demonstrando que um alelo mutante pode conferir resistência a vírus relacionados.

## **2.5 Durabilidade da resistência genética**

O uso da resistência genética é vantajoso, porque pode produzir proteção efetiva sem implicações adicionais de custos para o produtor durante a estação de plantio, além de não exigir mudanças tecnológicas no sistema de produção do agricultor. Essa opção é ambientalmente correta e mais segura para o consumidor. A maioria das espécies de

plantas possui genes de resistência a vírus disponíveis e, em muitos casos, cultivares com grau variável de resistência estão disponíveis comercialmente.

O desenvolvimento de cultivares resistentes, que também tenham alta produtividade e excelente qualidade de frutos, permanece um desafio para os melhoristas (SCOTT, 2005). Os melhoristas e fitopatologistas têm conduzido programas de melhoramento em graus sucessivos, incluindo o *screening* de coleções de germoplasma e caracterização dos seus fenótipos, estudando o modo de herança, identificando marcadores para realização da seleção assistida (SAM) (COLLARD; MACKILL, 2008), introduzindo características de resistência em cultivares-elite, além de avaliar o desempenho de novas cultivares em relação à resistência a doença no campo (KUMAR, 1999).

Quando se pensa em contribuição genética de material oriundo de banco de germoplasma, deve-se pensar na possibilidade de obtenção de genes de interesse e não de genótipos de plantas, que, por si só, ofereçam vantagens comparativas em relação às variedades atualmente cultivadas. Esses genes podem estar relacionados à resistência a doenças, pragas, bem como à adaptação a ambientes limitantes para o desenvolvimento das culturas. Por essas razões, os recursos genéticos armazenados no Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV são considerados estratégicos para o país, por representarem parte considerável da diversidade genética das hortaliças. Cabe ao Brasil preservar, caracterizar, avaliar e disponibilizar estes genes para a comunidade científica nacional e assim reduzir a erosão genética e ampliar a capacidade de sustentabilidade da agricultura nacional (SILVA, 2009).

O melhoramento para resistência na maioria dos cultivares consiste na introgressão de genes de um germoplasma exótico em cultivares-elite suscetíveis a doenças, por meio de retrocruzamentos sucessivos e, ou, assistidos por marcadores moleculares. O melhoramento para resistência durável em cultivares modernos promoveria a seleção de fatores de resistência juntamente com um *background* genético favorável (SKAMNIOTI; RIDOUT, 2005).

A quebra de resistência genética é o maior fator limitante para o sucesso do controle genético de doenças que afetam as principais culturas, tornando necessário que os melhoristas otimizem a escolha de melhores combinações gênicas para promover maior durabilidade da resistência. Entretanto, poucos experimentos explicam o motivo pelo qual, em determinado sistema patógeno-hospedeiro, uma cultivar permanece resistente enquanto outra tem sua resistência quebrada rapidamente.

Harrison (2002), comparando a durabilidade relativa da resistência a vírus em plantas, relatou que quanto maior o número de mutações necessárias para obtenção da virulência, maior a durabilidade da resistência. A quebra de resistência está relacionada também com o *background* genético (PALLOIX *et al.*, 2009) e a frequência de quebra de resistência governada por um gene de efeito maior é maior quando introduzido em um cultivar que já apresenta *background* genético de suscetibilidade.

Para a cultura do pimentão, onde há prejuízo econômico causado pelos potyvírus, cultivares comerciais produtivas e resistentes ao PVY e ao PepYMV foram disponibilizadas (TRUTA *et al.*, 2004). Entretanto, Gioria *et al.* (2009) relataram a presença do PepYMV em plantas de *Capsicum annuum* 'Magali R', uma cultivar caracterizada anteriormente como resistente a esse vírus, em campos de produção localizados na cidade de Lins, SP, demonstrando a quebra de resistência.

Com o aumento da incidência do PepYMV nas culturas do tomateiro e do pimentão, é necessária a obtenção de novas fontes de resistência a este vírus para utilização em programas de melhoramento. Em tomateiro, Giordano *et al.* (1999) relatam a presença de fontes de resistência a viroses, de modo geral em espécies silvestres de *Solanum*, principalmente em *S. peruvianum*, *S. pimpinellifolium*, *S. chilense* e *S. hirsutum*. Juhasz *et al.* (2008) identificaram uma fonte de resistência em uma subamostra de *Solanum habrochaites* f. *glabratum* pertencente ao Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV). O padrão de herança deste gene de resistência ao potyvírus PepYMV foi determinado como sendo recessivo monogênico.

A existência de sintenia entre membros da família Solanaceae, como o tomateiro e o pimentão, em relação à presença de genes de resistência a vírus do mesmo gênero, poderia ser utilizada como estratégia para obtenção de fontes de resistência visando a utilização em ambas as espécies de plantas. Essa relação entre os genes de resistência foi descrita por Parrella e Ruffel (2002), que investigaram a genética comparativa da resistência a potyvírus, como o PVY e o TEV, entre pimentão e tomateiro, demonstrando que a resistência é eficiente contra vários isolados de ambos os vírus, e que os genes estão localizados em regiões colineares dos cromossomos destas duas espécies.

A caracterização do gene conferindo resistência recessiva contra o PVY em pimentão foi realizada por Ruffel *et al.* (2002), demonstrando que este gene corresponde ao locus *pvr2* e codifica o fator de iniciação da tradução eIF4E. Além disso, Zhang *et al.* (2009) realizaram a clonagem e a caracterização molecular do eIF4E e sua isoforma

eIFiso4E de plantas de tomateiro e demonstraram, por meio análise filogenética, que as sequências desses dois genes são semelhantes entre espécies da família Solanaceae, como o tabaco, o tomateiro e o pimentão. Esses resultados sugerem a relação entre os genes de resistência a potyvírus em espécies botanicamente relacionadas, e a possibilidade do uso de estratégias conjuntas para identificação e clonagem de genes de resistência a potyvírus pertencentes às espécies de plantas da família Solanaceae.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Retrocruzamentos para introgressão do gene de resistência ao PepYMV em linhagens de tomate

A primeira etapa do trabalho foi a hibridação, para obtenção das sementes do híbrido F<sub>1</sub> das gerações segregantes F<sub>2</sub> e dos retrocruzamentos sucessivos. As sementes híbridas F<sub>1</sub> foram obtidas pelo cruzamento da cultivar Santa Clara, suscetível ao PepYMV e do acesso resistente de *Solanum habrochaites* f. *glabratum* (BGH6902). Para realização dos cruzamentos, os genitores foram cultivados em casa de vegetação, utilizando-se 30 plantas da cultivar suscetível (P1) como genitores femininos e cinco plantas do acesso resistente (P2) como doadores de pólen (JUHASZ *et al.*, 2006)

Após obtenção das sementes do retrocruzamento, foi realizada a autofecundação com posterior inoculação nas plantas com o PepYMV para seleção de plantas resistentes, dando, assim, continuidade ao processo de retrocruzamento com o genitor recorrente Santa Clara.

O inóculo foi preparado por maceração de folhas de *Nicotiana debneyi* infectadas com o isolado 3 do PepYMV (TRUTA *et al.*, 2004) em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,2 contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,01 %. A inoculação consistiu na fricção desse extrato em folhas de plantas com 15 dias após o transplântio previamente pulverizadas com carborundum 600 mesh. As plantas foram inoculadas três vezes com intervalos de 24 horas para evitar escapes.

Plantas com 30 dias após a inoculação foram avaliadas por meio do teste sorológico ELISA indireto (CLARK *et al.*, 1986), usando antissoro para PepYMV produzido por Truta *et al.* (2004). Plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara foram inoculadas somente com tampão de inoculação para uso como controle negativo, e as plantas dessa mesma cultivar inoculadas com o PepYMV foram usadas como controle positivo.

Após a reação enzimática, a intensidade de cor foi medida em valores de absorvância (405 nm), sendo considerado como leitura positiva valores maiores que duas vezes o valor do controle negativo. Assim, as plantas que tiveram valor de leitura abaixo de duas vezes o valor do controle negativo, foram selecionadas como resistentes.

### 3.2 Avaliação do espectro de ação da resistência do acesso BGH6902 a potyvírus

Para avaliação do espectro de ação da resistência do acesso BGH6902 a outros potyvírus como o PVY<sup>N</sup>, o experimento foi realizado em condições de casa de vegetação em Viçosa, MG, durante o ano de 2011, em delineamento em blocos casualizados com cinco repetições. As plantas foram semeadas individualmente em bandejas de isopor e transplantadas para vasos plásticos de um litro, considerando-se cada planta como uma unidade experimental.

Plantas de pimentão, cultivar IKEDA, infectadas com PVY<sup>N</sup>, foram usadas como fonte de inóculo. O preparo do inóculo e a inoculação via extrato vegetal tamponado foram realizados conforme descrito anteriormente para o PepYMV. Plantas com 21 dias após a inoculação foram avaliadas por ELISA indireto, conforme descrito anteriormente.

### 3.3 Amplificação da região codificadora do eIF4E e eIF(iso)4E

A linhagem S3-59, resistente a PepYMV, oriunda de ciclo de seleção sobre o acesso BGH6902 e a linhagem suscetível SC30, obtida da cultivar Santa Clara, ambas previamente caracterizadas por Juhasz *et al.* (2006), foram utilizadas como resistentes e susceptíveis, respectivamente, ao isolado 3 do PepYMV. O RNA total foi extraído a partir de 0,1 g de folhas, utilizando-se o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), conforme instruções do fabricante. O RNA foi ressuspendido em água Milli-Q, tratada com DEPC, para uma concentração final de 0,2 a 0,3 µg/µL.

O RNA foi utilizado como molde para a síntese de cDNA, utilizando-se a enzima *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados os oligonucleotídeos eIF4EFw-(5'-ATG GCA GCA GCT GAA ATG -3') e eIF4E Rv (5'-CTA TAC GGT GTA ACG ATT CTT-3') para amplificação do eIF4E (número de acesso no Genbank AF259801) e eIF(iso)4EFw (5'-TCG TGA AAA AGC TAT ACA AAA GGA C-3') e eIF(iso)4ERv-(5'-CAA TAC ATC CAA ACA TAC ATC AAG T-3') para amplificação do eIF(iso)4E (número de acesso no Genbank EU 119958).

As reações em cadeia de polimerase (PCR) para amplificação da região correspondente ao gene de cada genótipo foram realizadas em um volume total de 25 µL,

utilizando-se 2 µL de cDNA, 2,5 µL do tampão da enzima, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2,0 µL de mistura de dNTPs (10 mM), 20 pmol de cada oligonucleotídeo e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Promega), completando-se o volume com água. A amplificação foi realizada em 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento dos oligonucleotídeos a 57 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL foi utilizada para análise dos produtos de amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose (0,7 %).

### **3.4 Clonagem e sequenciamento dos fragmentos amplificados**

Os fragmentos de DNA amplificados foram ligados no plasmídeo pGEM-T-Easy (Promega), conforme as instruções do fabricante e, em seguida, foram transformados em células competentes de *Escherichia coli* DH5α pelo método do choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O DNA plasmidial dos transformantes foi extraído pelo método da lise alcalina e clivado com a enzima *EcoR* I, liberando o fragmento genômico inserido. O sequenciamento de todos os clones foi realizado pela MacroGen Inc. (disponível em: <[www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)>).

### **3.5 Análise filogenética**

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos alelos do gene eIF4E e eIF(iso)4E do acesso BGH6902 e da cultivar do Santa Clara foram comparadas entre si e entre sequências de outros alelos depositadas no GenBank.

Alinhamentos foram obtidos utilizando-se o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) e a partir dos alinhamentos foram preparadas análises filogenéticas utilizando-se o Método da Máxima Verossimilhança com 1.000 repetições de *bootstraps*, utilizando-se o programa MEGA 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na inserção de alelo recessivo, via método de retrocruzamentos, os indivíduos resistentes no segundo retrocruzamento (RC<sub>2</sub>) são retrocruzados com o genitor recorrente, gerando indivíduos RC<sub>3</sub> com o genótipo heterozigoto. Assim, com a avaliação da resistência genética ao PepYMV (Tabela 1) realizada nas progênes oriundas do segundo retrocruzamento realizado com a genitor recorrente suscetível Santa Clara, medida por meio da concentração viral, via teste ELISA Indireto, constatou-se a ocorrência de 30 progênes com resistência genética ao PepYMV. Esses resultados, com destaque para o RC2-98-2 e RC2-123-10- que obtiveram valores baixos de concentração viral, tornam estas progênes possíveis fontes de resistência a serem usadas em programas de retrocruzamentos para obtenção de linhagens de tomate resistentes ao PepYMV.

Sendo o objetivo do método dos retrocruzamentos a inserção de alelos de características de interesse com recuperação do genótipo recorrente, é importante considerar que após a avaliação da resistência genética citada na Tabela 1, as progênes resistentes foram submetidas a um ciclo de autofecundação natural, em condições de campo, para ser atingida a homozigose do gene de resistência ao PepYMV, em virtude do fato de esse ser monogênico recessivo (JUHASZ *et al.*, 2008).

Após terem sido obtidas sementes das progênes autofecundadas, estas foram avaliadas novamente em relação à resposta à inoculação mecânica com o PepYMV, para seleção das plantas resistentes e, assim, realizar o terceiro retrocruzamento (RC<sub>3</sub>) com o genitor recorrente Santa Clara com vista à utilização futura de linhagens endogâmicas para produção de híbridos comerciais de tomate resistentes ao PepYMV. Como esta característica de resistência genética foi caracterizada como monogênica e recessiva por Juhasz *et al.* (2008), esta resistência deve ser introduzida em todas as linhagens que serão utilizadas para a produção do híbrido, com o objetivo de assegurar a expressão da característica no híbrido F<sub>1</sub>.

Pesquisas utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no GenBank (disponível em: <blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando as duas sequências de nucleotídeos obtidas, possibilitaram a identificação de similaridades significativas de aminoácidos tanto de eIF4E quanto de eIF(iso)4E com outras espécies vegetais (Tabela 2).

Tabela 1 – Resultado das avaliações relativas à resistência genética ao PepYMV nas plantas oriundas do segundo retrocruzamento realizado com o genitor recorrente Santa Clara

Retrocruzamento	Absorbância	Avaliação	Retrocruzamento	Absorbância	Avaliação
RC2-104-1	0,250	R	RC2-159-2	0,357	S
RC2-104-2	0,354	S	RC2-159-3	0,138	R
RC2-104-3	0,132	R	RC2-159-4	0,228	R
RC2-104-4	0,538	S	RC2-159-5	0,244	R
RC2-104-5	0,148	R	RC2-159-6	0,177	R
RC2-104-6	0,405	S	RC2-159-7	0,229	R
RC2-104-7	0,155	R	RC2-159-8	0,332	S
RC2-104-8	0,453	S	RC2-159-9	0,217	R
RC2-123-1	0,201	R	RC2-197-1	0,182	R
RC2-123-10	0,141	R	RC2-197-3	0,143	R
RC2-123-3	0,546	S	RC2-197-4	0,212	R
RC2-123-4	0,126	R	RC2-197-5	0,156	R
RC2-123-5	0,455	S	RC2-197-6	0,153	R
RC2-123-6	0,176	R	RC2-209-1	0,287	S
RC2-123-8	0,231	R	RC2-209-2	0,433	S
RC2-136-2	0,165	R	RC2-209-4	0,151	R
RC2-136-3	0,201	R	RC2-209-5	0,408	S
RC2-136-4	0,236	R	RC2-209-6	0,476	S
RC2-136-5	0,172	R	RC2-209-7	0,193	R
RC2-136-6	0,329	S	RC2-67-1	0,335	S
RC2-136-7	0,367	S	RC2-98-1	0,149	R
RC2-136-8	0,158	R	RC2-98-2	0,117	R
RC2-159-1	0,167	R	RC2-98-3	0,552	S
CN	0,135	0,270**	CN	0,135	0,270**
CP	0,476		CP	0,476	

\* CN = controle negativo; e CP = controle positivo.

\*\* Valor relativo a duas vezes o valor da absorbância das leituras realizadas sobre o controle negativo.

R = resistente; e S = suscetível.

A comparação das sequências de aminoácidos do alelo do eIF4E, obtidos neste trabalho, com as descritas na literatura, permite observar uma identidade de 100 % entre o acesso BGH6902 e o PII34417, pertencentes também à espécie *Solanum habrochaites*, não havendo variação alélica entre eles. Esse acesso, segundo Ruffel *et al.* (2005), possui suscetibilidade à incidência potyvírus *Potato virus Y* (PVY) e o *Tobacco etch virus* (TEV).

Tabela 2 – Sequências de aminoácidos com alinhamentos significantes à sequência de aminoácidos do eIF4E e do eIF(iso)4E do acesso resistente BGH6902

	Número de Acesso	Descrição	Cobertura de Sequência (%)	E value	Identidade Máxima (%)
eIF4E	<a href="#">AAV88612.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum habrochaites</i> ]	100	1,00E-171	100
	<a href="#">AAV88610.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	100	4,00E-169	98
	<a href="#">AAV88613.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum habrochaites</i> ]	100	3,00E-168	98
	<a href="#">NP_001234260.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	100	2,00E-159	98
	<a href="#">AAV88611.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	100	2,00E-159	98
	<a href="#">NP_001234459.1</a>	eIF4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ] eIF4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	100	2,00E-159	98
	<a href="#">NP_001233929.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	100	7,00E-159	98
	<a href="#">NP_001233935.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	100	7,00E-159	98
	<a href="#">AEW07371.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	2,00E-154	95
	<a href="#">CBJ34335.1</a>	Translation initiation factor eIF4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	4,00E-146	95
	<a href="#">AEX01233.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	6,00E-154	94
	<a href="#">AEX01234.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	2,00E-153	94
	<a href="#">CBJ34334.1</a>	Translation initiation factor eIF4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	2,00E-153	94
	<a href="#">AEX01235.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	7,00E-153	94
	<a href="#">AEW07372.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E eIF4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	7,00E-153	93
eIf(iso)4E	<a href="#">ACV74553.1</a>	Translation initiation factor eIF(iso)4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	82	3,00E-115	99
	<a href="#">NP_001234772.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor iso4E [ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	100	1,00E-143	99
	<a href="#">CBJ34336.1</a>	Translation initiation factor eIF(iso)4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	5,00E-143	99
	<a href="#">CBJ34337.1</a>	Translation initiation factor eIF(iso)4E [ <i>Solanum tuberosum</i> ]	100	2,00E-141	98
	<a href="#">CBL94689.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor, partial [ <i>Capsicum baccatum</i> ]	97	2,00E-133	93
	<a href="#">CBL94685.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor, partial [ <i>Capsicum annuum</i> ]	97	5,00E-133	93
	<a href="#">CBL94695.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor, partial [ <i>Capsicum pubescens</i> ]	97	2,00E-132	93
	<a href="#">CBL94692.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor, partial [ <i>Capsicum annuum</i> ]	97	2,00E-132	93
	<a href="#">CBL81074.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor 4E, partial [ <i>Capsicum baccatum</i> ]	97	2,00E-132	93
	<a href="#">CBL94700.1</a>	Eukaryotic translation initiation factor, partial [ <i>Capsicum annuum</i> ]	97	3,00E-132	93
	<a href="#">AAV62607.1</a>	Eukaryotic initiation factor 4E [ <i>Capsicum annuum</i> ]	100	1,00E-134	93
	<a href="#">AAU06579.1</a>	Eukaryotic initiation factor iso4E [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	100	1,00E-135	93

Informações relativas à avaliação da resistência genética da linhagem S3-59 (Tabela 3), oriunda do acesso BGH6902 em relação à incidência do *Potato virus Y* (PVY), indicaram que a linhagem proveniente deste acesso foi também resistente à inoculação mecânica deste potyvírus. Esse resultado demonstra a amplitude de resistência genética contida neste acesso relacionada com a resistência a diferentes estirpes do PVY e também a necessidade de avaliação de acessos de tomate a diferentes estirpes da mesma espécie de potyvírus para aferir sobre o espectro de ação da resistência genética.

Tabela 3 – Valores de absorvância a 405 nm avaliados no extrato retirado de folhas do acesso BGH6902, inoculado com o PVY, em condições de vaso em casa de vegetação

Acesso	Valor da Absorvância (405 nm)
S3-59 (BGH6902)	0,437
*Controle negativo	0,676
Controle positivo	1,185

\* Valor relativo a duas vezes o valor da absorvância das leituras realizadas no controle negativo Santa Clara (0,338).

Resultados como os obtidos acima corroboram com os relatados por Nieto *et al.* (2007) avaliando a variação alélica do eIF4E, observada em diferentes acessos de melão (*Cucumis* sp.) em relação à resistência às duas estirpes da mesma espécie de *Melon necrotic spot virus* (MNSV-Mα5 E MNSV-2640), demonstrando que diferentes acessos contendo mesmo alelo do eIF4E tenham diferenças relacionadas com a resistência genética com a variação da estirpe viral inoculada. Entretanto, estudos demonstrando que as variações alélicas de genes relacionados com a resistência a potyvírus, como o realizado por Nieto *et al.* (2007), demonstram que o resultado do sequenciamento de cDNA de eIF4E não mostrou nenhuma diferença entre acessos de melão resistentes e suscetíveis quando inoculados com *Watermelon mosaic virus* (WMV), demonstrando que a resistência genética a potyvírus pode ser condicionada com a ação de outros genes de resistência que não seja o eIF4E.

Segundo Gonzalez-Ibeas *et al.* (2012), os mecanismos de resistência nestes casos, onde não foi observado o polimorfismo entre os alelos de resistência, poderiam envolver a presença de pequenos RNA, o qual a expressão foi detectada em um alto nível no acesso de melão resistente ao WMV (TGR-1551) e em baixo nível no acesso suscetível (Tendral).

Na comparação da variação alélica presente no acesso resistente BGH6902 em relação à linhagem suscetível Santa Clara, como mostrado nas Figuras 2 e 5, os oligonucleotídeos geraram fragmentos de eIF4E com 696 nucleotídeos e de 603 nucleotídeos para eIF(iso)4E, tanto para o acesso BGH6902, como para Santa Clara.

Alinhamentos das sequências de nucleotídeos do alelo eIF4E entre o acesso resistente ao PepYMV (BGH6902) e o suscetível (Santa Clara) revelaram a presença de oito polimorfismos de um único nucleotídeo, sendo quatro substituições de C para T, localizadas nas posições C205T, C210T, C264T e C648T; uma de G para C, localizada na posição G253C; uma de A para C, na posição A367C; uma de T para C, na posição T621C; e uma de A para G, na posição A671G, conforme pode ser observado na Figura 2. Entretanto, nem todas essas substituições levaram a mudanças nos aminoácidos, ocorrendo apenas quatro substituições não sinônimas nas posições P69S, V85L, K123Q e N224S (Figura 3).

As comparações com sequências de aminoácidos do alelo eIF4E pode ser melhor visualizada na Figura 4, onde se observam três substituições em relação ao acesso PI-247087, nas posições L48F, N67K, A76D e M109I. Em trabalho realizado por Parrella e Ruffel (2002), o acesso PI-247087 apresenta tolerância para o PVY; entretanto não há relatos de avaliação de resistência para PepYMV.

Mudanças também foram observadas entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos do alelo eIF(iso)4E do resistente BGH6902 e do suscetível Santa Clara, como podem ser vistas nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Essas mudanças ocorreram nas posições T60G, T137C, C166T, T183C, G229T, T231G, G417A, G437A, G516A e G523A, sendo não sinônimas as substituições T231G, C166T, T137C e G523A, levando a substituições de aminoácidos nas posições V46A, H56Y, V78L, V175I.

Além da comparação das sequências de aminoácidos entre os alelos obtidos neste trabalho, também foi realizada a comparação com os alelos já descritos na literatura.

Uma característica peculiar dos genes controlando a resistência a potyvírus em diferentes espécies de plantas é que, em espécies infetadas por mais de um potyvírus, como o pimentão e o tomateiro, o mesmo *locus* frequentemente confere resistência a diferentes espécies de vírus (NIETO *et al.*, 2007). Comparando os aminoácidos entre os alelos do eIF(iso)4E pertencentes a culturas do pimentão e tomate (Figura 7), identifica-se a diferença no número de aminoácidos de cada alelo, sendo que em tomate (BGH6902), a proteína tem um total de 198 contra 200 aminoácidos em pimentão.

```

eIf4E- M2R10-BGH-6902      ATGGCAGCAGCTGAAATGGAGAGAACGATGTCGTTTGATGCAGCTGAGAAGTTGAAGGCC 60
eIf4E- SCP2-12-SC          ATGGCAGCAGCTGAAATGGAGAGAACGATGTCGTTTGATGCAGCTGAGAAGTTGAAGGCC 60
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      GCCGATGGAGGAGGAGGAGAGGTAGACGATGAACTTGAAGAAGGTGAAATTGTTGAAGAA 120
eIf4E- SCP2-12-SC          GCCGATGGAGGAGGAGGAGAGGTAGACGATGAACTTGAAGAAGGTGAAATTGTTGAAGAA 120
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      TCAAATGATACGGCATCGTATTTAGGAAAGAAATCACAGTGAAGCATCCATTGGAGCAT 180
eIf4E- SCP2-12-SC          TCAAATGATACGGCATCGTATTTAGGAAAGAAATCACAGTGAAGCATCCATTGGAGCAT 180
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      TCATGGACTTTTTGGTTTGATAAACCCTACTACTAAATCTCGACAAACTGCTTGGGGAAGC 240
eIf4E- SCP2-12-SC          TCATGGACTTTTTGGTTTGATAAACCCTACTACTAAATCTCGACAAACTGCTTGGGGAAGC 240
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      TCACCTCGAAATCTCTACACTTTTCCACTGTTGAAGATTTTGGGGTGCTTACAATAAT 300
eIf4E- SCP2-12-SC          TCACCTCGAAATCTCTACACTTTTCCACTGTTGAAGATTTTGGGGTGCTTACAATAAT 300
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      ATCCATCACCCAAGCAAGTTAATTATGGGAGCAGACTTTCATTGTTTTAAGCACAAAAT 360
eIf4E- SCP2-12-SC          ATCCATCACCCAAGCAAGTTAATTATGGGAGCAGACTTTCATTGTTTTAAGCACAAAAT 360
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      GAGCCAAGTGGGAAGATCCTGTATGTGCCAATGGAGGGACGTGGAAAATGAGTTTTTCG 420
eIf4E- SCP2-12-SC          GAGCCAAGTGGGAAGATCCTGTATGTGCCAATGGAGGGACGTGGAAAATGAGTTTTTCG 420
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      AAGGGTAAATCTGATACCAGCTGGCTGTATACGCTGCTGGCAATGATTGGACATCAATC 480
eIf4E- SCP2-12-SC          AAGGGTAAATCTGATACCAGCTGGCTGTATACGCTGCTGGCAATGATTGGACATCAATC 480
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      GATCATGGAGATGAAATTTGTGGAGCAGTTGTTAGTGTCCGGGCTAAGGGAGAAAAATA 540
eIf4E- SCP2-12-SC          GATCATGGAGATGAAATTTGTGGAGCAGTTGTTAGTGTCCGGGCTAAGGGAGAAAAATA 540
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      GCTTTGTGGACCAAGAATGCTGCAATGAAACAGCTCAGGTTAGCATTGGTAAGCAATGG 600
eIf4E- SCP2-12-SC          GCTTTGTGGACCAAGAATGCTGCAATGAAACAGCTCAGGTTAGCATTGGTAAGCAATGG 600
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      AAGCAGTTTCTAGATTACAGCTGATTTCGGTTGCTTCATATTTACAGATGATGCAAAAGAG 660
eIf4E- SCP2-12-SC          AAGCAGTTTCTAGATTACAGCTGATTTCGGTTGCTTCATATTTACAGATGATGCAAAAGAG 660
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      CTCGACAGAAAGTGCCTAAGATCGTTACACCGTATAG 696
eIf4E- SCP2-12-SC          CTCGACAGAAAGTGCCTAAGATCGTTACACCGTATAG 696
*****

```

Figura 2 – Alinhamento realizado com as sequências de nucleotídeos do eIF4E do acesso resistente BGH-6902 e suscetível Santa Clara.

```

eIf4E- M2R10-BGH-6902      MAAAEEMERTMSFDAEKLKAADGGGGEVDELEEGEIVEESNDTASYLGKEITVKHPLEH 60
eIf4E- SCP2-12-SC          MAAAEEMERTMSFDAEKLKAADGGGGEVDELEEGEIVEESNDTASYLGKEITVKHPLEH 60
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      SWTFWFDNSTTKSRQTAWGSSLRNLVYTFSTVEDFWGAYNNIHHP SKLIMGADFHCFKHKI 120
eIf4E- SCP2-12-SC          SWTFWFDNPTTKSRQTAWGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIHHP SKLIMGADFHCFKHKI 120
*****

eIf4E- M2R10-BGH-6902      EPQWEDPVCANGGTWKMSFSKGS S DTSWLYTLLAMIGHQFDHGDEICGAVVSVRAKGEKI 180
eIf4E- SCP2-12-SC          EPKWEDPVCANGGTWKMSFSKGS S DTSWLYTLLAMIGHQFDHGDEICGAVVSVRAKGEKI 180
**:*

eIf4E- M2R10-BGH-6902      ALWTKNAANETAQVSI GKQWKQLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRS AKNRYTV 231
eIf4E- SCP2-12-SC          ALWTKNAANETAQVSI GKQWKQLDYSDSVGFI FHDDAKRLDRN AKNRYTV 231
*****

```

Figura 3 – Alinhamento das sequências de aminoácidos do eIF4E do acesso resistente BGH6902 e suscetível Santa Clara.

eIf4E- M2R10-BGH-6902	M A A A E M E R T M S F D A A E - - K L K A A D G G G G E V D D E L E E G E I V E E S N D T A S Y L	50
eIf4E- SCP2-12-SC	. . . . .	50
eIf4E- L.h.-pot-1- PI 247087	. . . . .	F 50
eIf4E- L.h. pot-1+ PI 134417	. . . . .	50
eIf4E- L.e.-pot-1+ Mosp	. . . . .	50
eIF4E-tomate Zhongshu	. . . . . G - - . . . . .	50
eIF4E-pimentãoYoloWonder	. . T . . . . K . T T . . E . . - - . V . L - - - N A N . A . . . V . . . . . T D . . T . . .	50
eIF4E-pimentãoYY-Yolo Y	. . T . . . . K . T T . . E . . - - . V . L - - - N A N . A . . . V . . . . . T D . . T . . .	50
eIF4E-pimentãoFlorida VR2	. . T . . . . K . T T . . E . . - - . V . L - - - N A N . A . . . V . . . . . T D . . T . . .	50
eIF4E-Milho	. . E E T D T . P A . A G S R G - - - - - R P A P E . . D R . . . . . T D L A C A P - - - -	50
eIF4E-RiceNipponbare	. . E E H E T . P P . A G R P P - - - - - S S G R . R A D D A . . R . . . . . A D D D S G H . P P Q	50
eIF4E-trigo	. . E D T E T . P A . A G . E . - - - - - - - - - - - - - - - R . . . . . A D D G D G S S A A A	50
eIF4E-Arabidopsis	. . V E D T P K S V V T E E . K P N S I E N P I D R Y H . E G . D A . . . . . A G G E G . G N V D E	50
eIF4E-fumo	. - V D . V . K P V . L E E S K - - - - - - - - - - - T N T R E V E . . . . . G . . D . . M . S .	50
eIF4E-alface	. - K S . E Q K L I D V N K H R - - G V R - - - - - S D . . E . E Q . . . . . G G D A . . L . S S	50

Figura 4 – Alinhamento das sequências de aminoácidos do eIF4E de cultivares de pimentão (Yolo Wonder, Yolo Y, Florida-VR2), tomate (BGH6902, Santa Clara, PI-134417, PI-247087, Mospomolist, Zhongshu5), milho, arroz, trigo, fumo e alface. (Continua...)

eilf4E- M2R10-BGH-6902	G K - - - - E I T V K H P L E H S W T F W F D N S T T K S R Q T A W G S S L R N L Y T F S T V E D F	100
eilf4E- SCP2-12-SC	. . . . . P . . . . . V . . . . .	100
eilf4E- L.h.-pot-1- PI 247087	. . . . . K . . . . . D . . . . .	100
eilf4E- L.h. pot-1+ PI 134417	. . . . .	100
eilf4E- L.e.-pot-1+ Mospo	. . . . . P . . . . . V . . . . .	100
eilf4E-tomate Zhongshu	. . . . . P . . . . . V . . . . .	100
eilf4E-pimentãoYW	S . . . . . A T . . . . . P V A . . K . A . . . . . V . . . . .	100
eilf4E-pimentãoYY-Yolo Y	S . . . . . A T . . . . . P E A . . K . A . . . . . R . . V . . . . .	100
eilf4E-pimentãoFlorida VR2	S . . . . . A T . . . . . P E A . . K . A . . . . . V . . . . .	100
eilf4E-Milho	- - - - - S P P A T . . . . . P Q S . . K . A . . . . . I . P I H . . . . . E .	100
eilf4E-ArrozNipponbare	A N P - - - - A A P - - . . . . . A . . . . . P Q G . . K . A T . . . . . I . P I H . . . . .	100
eilf4E-trigo	A G - - - - R . . A - . . . . . N A . . . . . P Q G . . . . V . . . . . T I H P I H . . . . .	100
eilf4E-Arabidopsis	S S K S - - G V P E S . . . . . P A V . . K . . S . . . . . P V F . . . . . E .	100
eilf4E-fumo	. N P - - - S M A M . . A . . . . . P S G . . K . A . . . . . I . P I . . . . .	100
eilf4E-alface	S S S R P G T A I A Q . . . . . T P S A . . K . V . . . . . M . P I . . . . . S . . E .	100

Figura 4, Cont.





elf4E- M2R10-BGH-6902	S I G K Q W K Q F L D Y S D S V G F I F H D D A K R L D R S A K N R Y T V	237
elf4E- SCP2-12-SC	. . . . . N . . . . .	237
elf4E- L.h.-pot-1- PI 247087	. . . . .	237
elf4E- L.h. pot-1+ PI 134417	. . . . .	237
elf4E- L.e.-pot-1+ Mospo	. . . . . N . . . . .	237
elf4E-tomate Zhongshu	. . . . . N . . . . .	237
elf4E-pimentãoYoloWonder	. . . . . N . . . . .	237
elf4E-pimentãoYY-Yolo Y	. . . . . N . . . . .	237
elf4E-pimentãoFlorida VR2	. . . . . N . . . . .	237
elf4E-Milho	. . . . . E L . . . K . . I . . . V . . . . K M . K G L . E . . . .	237
elf4E-ArrozNipponbare	. . . . . E . . . . K . . I . . . V . . . . K M . K G L . . . . .	237
elf4E-trigo	. . . . . E . . . . K . . I . . . V . E . . . . S . K G P . . . . .	237
elf4E-Arabidopsis	. . . . . E . . . . N N . I . . . I . E . . . . K . . . . N . . . . A . . A	237
elf4E-fumofumo	. . . . . E . . . . N . . . . . K . . . . A . . . . . S .	237
elf4E-alface	. . . . . E . I . . . N . T I . . . . . E . . . . T . . . . . K . . . .	237

Figura 4, Cont.

```

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      ATGGCCACCGAAGCACCGGTAGAGGCGACGGAGATTCCGTCGGTAGCGGC 50
eIFiso4E-MSC-30                ATGGCCACCGAAGCACCGGTAGAGGCGACGGAGATTCCGTCGGTAGCGGC 50
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      GCGGAGACG GTGGAGAAGCAGCCGCATAAGCTAGAGAGGAAGTGGACGT 100
eIFiso4E-MSC-30                AGCGGAGACT GTGGAGAAGCAGCCGCATAAGCTAGAGAGGAAGTGGACGT 100
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      TCTGGTTCGATAACCAGTCTAAACCGAAACAAGGCGCGCTTGGGGAAGT 150
eIFiso4E-MSC-30                TCTGGTTCGATAACCAGTCTAAACCGAAACAAGGCGTCGCTTGGGGAAGT 150
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      TCTCTTCGAAAAGCTTATACTTTTGAACTGTGAGGAATTCTGGAGTTT 200
eIFiso4E-MSC-30                TCTCTTCGAAAAGCTCATACTTTTGAACTGTGAGGAATTCTGGAGTTT 200
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      ATATGATCAAATATTCAAGCCAGCAAGTCTACTGTTAATGCGGACTTTC 250
eIFiso4E-MSC-30                ATATGATCAAATATTCAAGCCAGCAAGCTTACTGTTAATGCGGACTTTC 250
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      ATTTGTTCAAAGCTGGGATTGAGCCCAAATGGGAAGATCCTGAGTGTGCC 300
eIFiso4E-MSC-30                ATTTGTTCAAAGCTGGGATTGAGCCCAAATGGGAAGATCCTGAGTGTGCC 300
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      AATGTTGGCAAGTGGACTGCTACTAGCAGCAGAAAGGCTAATCTCGAGAC 350
eIFiso4E-MSC-30                AATGTTGGCAAGTGGACTGCTACTAGCAGCAGAAAGGCTAATCTCGAGAC 350
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      TATGTGGCTAGAAACACTGATGGCATTGGTCGGCGAGCAATTTGATGAGT 400
eIFiso4E-MSC-30                TATGTGGCTAGAAACACTGATGGCATTGGTCGGCGAGCAATTTGATGAGT 400
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      CAGAAGATATATGTGGAGTGGTTGCTAGTGTGCGTAGAAGTCAGGATAAA 450
eIFiso4E-MSC-30                CAGAAGATATATGTGGAGTGGTTGCTAGTGTGCGTAGAAGTCAGGATAAA 450
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      CTTTCTTGTGGACTAAGACAGCCACCAATGAAGCAGCTCAGATGGGCAT 500
eIFiso4E-MSC-30                CTTTCTTGTGGACTAAGACAGCCACCAATGAAGCAGCTCAGATGGGCAT 500
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      TGGTAGGAAGTGGAAAGAGATCAATTGATGCCGAAAAGATATCCTATAGTT 550
eIFiso4E-MSC-30                TGGTAGGAAGTGGAAAGAGATCAATTGATGCCGAAAAGATATCCTATAGTT 550
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      TCCATGATGATTCTAAAAGAGAGAGGTGTCAGCTAAGAGCCGATATACTGTG 600
eIFiso4E-MSC-30                TCCATGATGATTCTAAAAGAGAGAGGTGTCAGCTAAGAGCCGATATACTGTG 600
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      TGA 603
eIFiso4E-MSC-30                TGA 603
*****

```

Figura 5 – Alinhamento realizado com as seqüências de nucleotídeos do eIF(iso)4E do acesso resistente BGH-6902 e suscetível Santa Clara.

```

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      MATEAPVEATEIPSVAAAETVEKQPHKLERKWTFFWFDNQSKPKQGAAWGS 50
eIFiso4E-MSC-30-SC            MATEAPVEATEIPSVAAAETVEKQPHKLERKWTFFWFDNQSKPKQGVAVGS 50
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      SLRKA YTFETVEEFWSLYDQIFKPSK LTVNADFHLFKAGIEPKWEDPECA 100
eIFiso4E-MSC-30-SC            SLRKA HTFETVEEFWSLYDQIFKPSK VTVNADFHLFKAGIEPKWEDPECA 100
*****:*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      NGGKWTATSSRKANLETMWLETLMALVGEQFDESEDICGVVASVRRSQDK 150
eIFiso4E-MSC-30-SC            NGGKWTATSSRKANLETMWLETLMALVGEQFDESEDICGVVASVRRSQDK 150
*****

eIFiso4E-M59-23-BGH-6902      LSLWTKTATNEAAQMGIGRKWKEI I DAEKLSYSFHDSDSKRERSAKSRYTV 200
eIFiso4E-MSC-30-SC            LSLWTKTATNEAAQMGIGRKWKEI V DAEKLSYSFHDSDSKRERSAKSRYTV 200
*****:*****

```

Figura 6 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos do eIF(iso)4E do acesso resistente BGH-6902 e suscetível Santa Clara.



Para investigar a relação evolutiva entre a família gênica eIF4E e eIF(iso)4E em diferentes espécies vegetais já descritas na literatura, uma análise filogenética foi realizada (Figura 8), o que possibilitou a formação de grupos distintos relacionados ao alinhamento de diferentes alelos do eIF4E e do eIF(iso)4E.

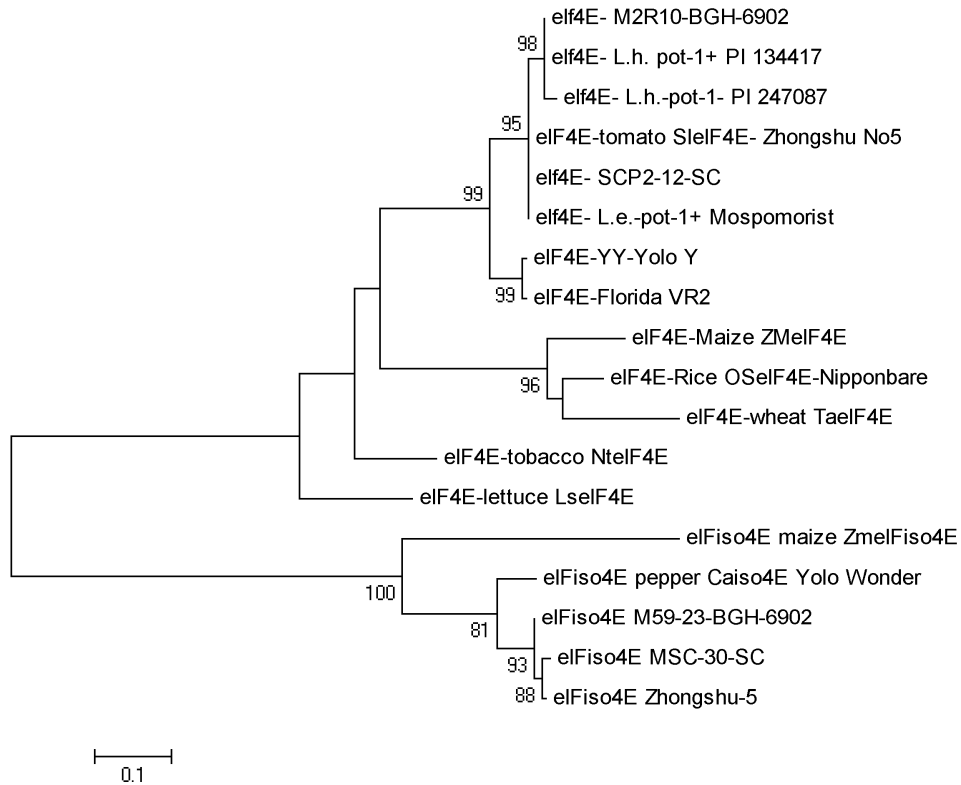


Figura 8 – Árvore filogenética de seqüências de aminoácidos dos alelos do eIF4E e eIF(iso)4E de diferentes espécies vegetais.

A família Solanácea foi agrupada em grupos semelhantes em relação a seus alelos do eIF(iso)4E, o mesmo ocorrendo para eIF4E, com exceção para a seqüência do fumo (eIF4E-tobacco), que ficou em grupo separado. Entretanto, em relação ao eIF4E houve distinção de grupos entre pimentão e tomate, ficando estes em grupos separados, sendo que as seqüências dos alelos do eIF4E pertencentes à espécie *Solanum habrochaites f. glabratum* ficaram agrupadas no mesmo grupo com os acessos BGH6902 e PI247087, ambos resistentes ao PVY.

Este resultado foi semelhante ao encontrado por Zhang *et al.* (2009), que realizaram a caracterização molecular do eIF(iso)4E de plantas de tomateiro e demonstraram, por meio da análise filogenética, que a seqüência do eIF(iso)4E e do eIF4E são semelhantes entre espécies da família Solanaceae, como o tabaco, o tomateiro e o pimentão.

Neste estudo, ambos os alelos do eIF4E e eIF(iso)4E tanto do acesso de tomate resistente (BGH6902) quanto da cultivar suscetível ao PepYMV (Santa Clara), foram clonados usando um oligonucleotídeo de sequência conhecida e estes alelos foram comparados com sequências já depositadas no Genbank. A análise de sequência, juntamente com as relações filogenéticas, revelaram que o eIF4E e eIF(iso)4E obtidos são altamente conservados com eIF4E e eIF(iso)4E, já descritos na literatura, apresentando pequeno número de polimorfismos entre o alelo suscetível e o resistente avaliado.

Os alelos eIF4E e eIF(iso)4E codificam duas proteínas distintas nas plantas e ambas têm a função na seleção de mRNA para tradução (ROBAGLIA; CARANTA, 2006), sendo que as diferenças também existem em promover a infecção viral e seu acúmulo em plantas hospedeiras. Além disso, eIF4E e sua isoforma estão envolvidos durante suas interações com o domínio central da VPg para promover a resistência.

A clonagem das sequências dos alelos eIF4E e eIF(iso)4E de tomate *Solanum habrochaites* produzem uma base para realização da caracterização da sua função na resistência a vírus. Com base na comparação das sequências de aminoácidos do eIF4E e eIF(iso)4E entre acessos resistentes e suscetível neste estudo, um mesmo número de polimorfismo foi detectado, servindo como um possível gene candidato para o entendimento da base molecular da resistência ao PepYMV no acesso BGH6902.

Mutações em fatores de iniciação da tradução (eIF4E, eIF(iso)4E, eIF4G ou eIF(iso)4G) resultam em resistência a viroses específicas em espécies vegetais (ROBAGLIA; CARANTA, 2006), incluindo dicotiledôneas (RUFFEL *et al.*, 2002; RUFFEL *et al.*, 2006; CHARRON *et al.*, 2008). Entretanto, não há relatos de estudos de identificação de genes que conferem resistência à estirpe 3 do PepYMV, usada neste trabalho, fazendo com que a clonagem do eIF4E de tomate resistente neste trabalho produza uma base para realização de sua função na resistência a este potyvírus, em estudos posteriores, por meio da identificação de polimorfismo de um único nucleotídeo no eIF4E ou eIF(iso)4E, com o desenvolvimento de marcadores moleculares relacionados com essas mutações.

Resistências de plantas a viroses, especificamente a potyvírus são, frequentemente herdadas recessivamente (PROVVIDENTI; HAMPTON, 1992). Para introgridir resistência à virose, as plantas precisam ser autofecundadas após uma ou duas gerações de retrocruzamento, seguidas de inoculação com o vírus para identificar a resistência, a qual aumenta o tempo para introduzir o alelo recessivo na linhagem de melhoramento. A seleção assistida por marcadores moleculares pode melhorar a eficiência de melhora-

mento no desenvolvimento de culturas como ervilha (SMYKAL *et al.*, 2010), em que foram utilizadas informações de marcadores ligados ao gene recessivo *sbm1* que confere resistência *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV), descritos por Gao *et al.* (2004).

Além disso, no caso de tomate, há necessidade de cultivares resistentes ao PepYMV, podendo, assim, ser otimizado o uso dessa importante fonte de resistência (BGH6902), em virtude da dificuldade em selecioná-la, como demonstrado por Juhasz *et al.* (2006). Assim, esta otimização pode ser feita com o desenvolvimento de marcadores moleculares, com a finalidade de selecionar genótipos resistentes a esse importante potyvírus, tornando-se um importante objetivo a ser alcançado a partir dos resultados encontrados neste trabalho.

## 5. CONCLUSÕES

- A comparação entre as sequências de aminoácidos do alelo do acesso resistente ao PepYMV (BGH6902), em relação ao alelo suscetível (Santa Clara), referente tanto ao alelo eIF4E quanto ao eIF(iso)4E, revelaram a presença de substituições não sinônimas entre as sequências destes alelos.

- Houve variabilidade genética entre as progênies oriundas do retrocruzamento entre o acesso BGH6902 e Santa Clara, resistente e suscetível ao PepYMV respectivamente, tornando, assim, possível a seleção de progênies resistentes para serem usadas no Programa de Melhoramento de Tomateiro da Universidade Federal de Viçosa.

## LITERATURA CITADA

ALBAR, L.; BANGRATZ-REYSER, M. *et al.* Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. *Plant Journal*, v. 47, n. 3, p. 417-426, Aug. 2006.

ÁVILA, A. C.; IONUE-NAGATA, A. K. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do Estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira*, v. 22, p. 655-658, 2004.

BENT, A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell*, v. 8, p. 1757-1771, 1996.

BERGER, P. H.; ADAMS, M. J. *et al.* Family *Potyviridae*. In: FAUQUET, C. M.; Mayo, M. A. *et al.* (Ed.). *Virus taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, Family *Potyviridae*, p. 819-841, 2005.

CARANTA, C.; LEFEBVRE, V. *et al.* Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 10, p. 872-878, 1997.

CARRINGTON, J. C.; DOUGHERTY, W. G. A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. In: PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, , v. 85, p. 3391-3395, 1988.

CARRINGTON, J. C.; JENSEN, P. E. *et al.* Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal*, v. 14, p. 393-400, 1998.

CARRINGTON, J. C.; WHITHAM, S. A. Viral invasion and host defense: strategies and counter- strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 1, p. 336-341, 1998.

CHARRON, C.; NICOLAI, M. *et al.* Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant Journal*, v. 54, n. 1, p. 56-68, Apr. 2008.

CHUNG, B. Y. W.; MILLER, W. A. *et al.* An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. In: PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, Apr. 2008.

CLARK, M. F.; LISTER, R. M. *et al.* ELISA techniques. *Methods in Enzymology*, v. 118, p. 742-766, 1986.

COLLARD, C. Y. B.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 363, p. 557-572, 2008.

- CRONIN, S.; VERCHOT, J. *et al.* Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell*, v. 7, n. 5, p. 549-559, 1995.
- DIANESE, E. C.; RESENDE, R. O. *et al.* High incidence of Pepper yellow mosaic virus in tomatoes in productive areas of Brazil's Federal District. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, n. 1, p. 67-68, Jan.-Feb. 2008.
- DIAZ-PENDON, J. A.; TRUNIGER, V. *et al.* Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, v. 5, n. 3, p. 223-233, May 2004.
- DO VALE, F. X. R.; JUNIOR, W. C. J. Manejo de doenças fúngicas em tomateiro. In: SILVA, D. J. H.; DO VALE, F. X. R. (Ed.). *Tomate – Tecnologia de produção*. Viçosa, 2007. p.1 59-197.
- DOLJA, V. V.; HALDEMAN CAHILL, R. *et al.* Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, v. 206, n. 2, p. 1007-1016, 1995.
- DOLJA, V. V.; HALDEMAN, R. *et al.* Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal*, v. 13, n. 6, p. 1482-1491, Mar. 1994.
- DOUGHERTY, W. G.; CARRINGTON, J. C. *et al.* Biochemical and mutational analysis of a plant virus cleavage site. *EMBO Journal*, v. 7, p. 1281-1287, 1988.
- DOUGHERTY, W. G.; PARKS, D. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*, v. 183, p. 449-456, 1991.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A. *et al.* (Ed.) *Virus taxonomy*. In: EIGHTH REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 1259.
- GAO, Z.; JOHANSEN, E. *et al.* The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J.*, v. 40, n. 3, p. 376-85, Nov. 2004.
- GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J. *et al.* Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *Journal of Virology*, v. 82, n. 15, p. 7601-7612, Aug. 2008.
- GIORDANO, L. B.; BEZERRA, I. C. *et al.* Breeding tomatoes for resistance to whitefly-transmitted geminivirus with bipartite genome in Brazil. *Acta Horticulturae*, v. 487, p. 357-360, 1999.
- GIORIA, R.; BRAGA, R. D. *et al.* Breakdown of resistance in sweet pepper against Pepper yellow mosaic virus in Brazil. *Scientia Agricola*, v. 66, n. 2, p. 267-269, 2009.

- GONZALEZ-IBEAS, D.; CANIZARES, J. *et al.* Microarray analysis shows that recessive resistance to watermelon mosaic virus in melon is associated with the induction of defense response genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 25, n. 1, p. 107-118, Jan. 2012.
- HARRISON, B. D. Virus variation in relation to resistance breaking in plants. *Euphytica*, v. 124, p. 181-192, 2002.
- HONG, Y.; HUNT, A. G. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, v. 226, n. 1, p. 146-151, 1996.
- INOUE-NAGATA, A. K.; FONSECA, M. E. N. *et al.* Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology*, v. 147, p. 849-855, 2002.
- JANZAC, B.; FABRE, F. *et al.* Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular Plant Pathology*, v. 10, n. 5, p. 599-610, Sept. 2009a.
- JANZAC, B.; FABRE, M. F. *et al.* Phenotype and spectrum of action of the Pvr4 resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plant Pathology*, v. 58, n. 3, p. 443-449, Jun. 2009b.
- JUHASZ, A. C. P.; DA SILVA, D. J. H. *et al.* Resistance genetic basis of a wild tomato access to pepper yellow mosaic virus. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 6, p. 713-720, Jun. 2008.
- \_\_\_\_\_. Screening of *Lycopersicon* sp accessions for resistance to *Pepper yellow mosaic virus*. *Scientia Agricola*, v. 63, n. 5, p. 510-512, Sept.-Oct. 2006.
- KASSCHAU, K. D.; CRONIN, S. *et al.* Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology*, v. 228, n. 2, p. 251-262, 1997.
- KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 143-182, 1999.
- KYLE, M. M.; PALLOIX, A. Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica*, v. 97, n. 2, p. 183-188, 1997.
- LAÍN, S.; MARTIN, M. T. *et al.* Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection - nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *Journal of Virology*, v. 65, n. 1, p. 1-6, Jan. 1991.
- LELLIS, A. D.; KASSCHAU, K. D. *et al.* Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.*, v. 12, n. 12, p. 1046-1051, 2002.

- LÉONARD, S.; PLANTE, D. *et al.* Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, v. 74, p. 7730-7737, 2000.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E.; COSTA, H. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 325-327, 2004.
- MAULE, A. J.; CARANTA, C. *et al.* Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, v. 8, n. 2, p. 223-231, Mar. 2007.
- MOURA, M. F.; MITUTI, T. A classification of Pepper yellow mosaic virus isolates into pathotypes. *European Journal of Plant Pathology*, v. 131, n. 4, p. 549-552, 2011.
- NICAISE, V.; GERMAN-RETANA, S. *et al.* The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology*, v. 132, n. 3, p. 1272-82, Jul. 2003.
- NIETO, C.; PIRON, F. *et al.* EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *Bmc Plant Biology*, v. 7, p. 21, Jun. 2007.
- PALAZZO, S. R.; BERGMANN, J. C. Surto de potyvírus associado ao mosaico amarelo do tomateiro no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 30, 2004.
- PALLOIX, A.; AYME, V. *et al.* Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist*, v. 183, n. 1, p. 190-199, 2009.
- PARRELLA, G.; RUFFEL, S. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 105, n. 6-7, p. 855-861, 2002.
- PARRELLA, G.; RUFFEL, S. *et al.* Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 105, n. 6-7, p. 855-861, Nov. 2002.
- PROVVIDENTI, R.; HAMPTON, R. O. Sources of resistance to viroses in the potyviridae. *Archives of Virology*, v. 5, p. 189-211, 1992.
- RESTREPO-HARTWIG, M. A.; CARRINGTON, J. C. Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology*, v. 66, n. 9, p. 5662-5666, Sept. 1992.
- ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, v. 11, n. 1, p. 40-45, Jan. 2006.

RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; FINDLAY, K. *et al.* The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology*, v. 236, p. 296-306, 1997.

ROJAS, M. R.; ZERBINI, F. M. *et al.* Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, v. 237, n. 2, p. 283-295, 1997.

RUFFEL, S.; CARANTA, C. *et al.* Structural analysis of the eukaryotic initiation factor 4E gene controlling potyvirus resistance in pepper: Exploitation of a BAC library. *Gene*, v. 338, p. 209-216, 2004.

RUFFEL, S. DUSSAULT, M. H. *et al.* A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal*, v. 32, n. 6, p. 1067-75, 2002.

RUFFEL, S.; GALLOIS, J. L. *et al.* The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Mol. Genet. Genomics*, v. 274, p. 346-353, Jun. 2005.

\_\_\_\_\_. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 2089-2098, Jul. 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. *Molecular cloning - A laboratory manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SCHAAD, M. C.; ANDERBERG, R. J. *et al.* Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology*, v. 273, n. 2, p. 300-306, Aug. 2000.

SCHAAD, M. C.; HALDEMAN-CAHILL, R. *et al.* Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology*, v. 70, n. 10, p. 7039-7048, 1996.

SCHAAD, M. C.; JENSEN, P. E. *et al.* Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal*, v. 16, n. 13, p. 4049-4059, 1997.

SCOTT, J. W. Perspectives on tomato disease resistance breeding: Past, present, and future. Leuven 1: International Society Horticultural Science. Perspectives on tomato disease resistance breeding: Past, present, and future: *Acta Horticulturae*, p. 217-224, 2005.

SHUKLA, D. D.; FRENKEL, M. J. *et al.* Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 13, n. 2, p. 178-191, Jun. 1991.

SILVA, D. J. H. *BGH - Banco de Germoplasma de Hortaliças*. Viçosa, 2009, 2011.

- SKAMNIOTI, P.; RIDOUT, C. J. Microbial avirulence determinants: guided missiles or antigenic flak? *Molecular Plant Pathology*, v. 6, p. 551, 2005.
- SMYKAL, P.; SAFAROVA, D. *et al.* Marker assisted pea breeding: eIF4E allele specific markers to pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) resistance. *Molecular Breeding*, v. 26, n. 3, p. 425-438, Oct. 2010.
- STEIN, N.; PEROVIC, D. *et al.* The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant Journal*, v. 42, n. 6, p. 912-922, Jun. 2005.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J. *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. *et al.* CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TRUTA, A. A. C.; SOUZA, A. R. R. *et al.* Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 160-168, 2004.
- WEI, T.; ZHANG, C. *et al.* Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 6, p.e1000962, 2010.
- WEN, R. H.; HAJIMORAD, M. R. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology*, v. 400, n. 1, p. 1-7, Apr. 2010.
- WITTMANN, S.; CHATEL, H. *et al.* Interaction of the viral protein genome linked [proteinase] of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, v. 234, n. 1, p. 84-92, 1997.
- YOSHII, M.; NISHIKIORI, M. *et al.* The *Arabidopsis* Cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode tip translation initiation factors 4E and 4G. *Journal of Virology*, v. 78, n. 12, p. 6102-6111, Jun. 2004.
- ZERBINI, F. M.; GUIMARÃES, L. M. Principais viroses do tomateiro e seu controle. In: (Ed.). *Tomate - Tecnologia de produção*. Viçosa, 2007. p. 257-282.
- ZERBINI, F. M.; ZAMBOLIM, E. M. A família Potyviridae. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 7, p. 1-66, 1999.
- ZHANG, Y. Y.; QI, M. F. *et al.* Molecular cloning and characterization of a gene encoding eukaryotic initiation factor iso4E in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 27, n. 3, p. 400-406, Sept. 2009.