

GAUS SILVESTRE DE ANDRADE LIMA

**RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ALELOS DO LOCO Sw-5
EM ESPÉCIES DE *LYCOPERSICON***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

GAUS SILVESTRE DE ANDRADE LIMA

**RESISTÊNCIA A TOSPOVÍRUS, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ALELOS DO LOCO *Sw-5*
EM ESPÉCIES DE *LYCOPERSICON***

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

APROVADA: 31 de janeiro de 2001.

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Conselheiro)

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Conselheiro)

Prof. Luiz Antônio Maffia

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

À minha saudosa mãe Eliane,
pelo estímulo aos meus ideais
e pelo grande exemplo de
perseverança,

Dedico

Aos meus filhos Yuri e Letícia,
À minha esposa Iraldes,
Ao meu pai Jonas e aos irmãos Giani e Gustavo,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela orientação.

Aos professores Acelino Couto Alfenas, Francisco Murilo Zerbini, Luiz Antônio Maffia e Wagner Campos Otoni, pela colaboração e sugestões durante a execução e redação desse trabalho.

Ao Dr. Júlio César Franco de Oliveira, pela amizade e indispensável contribuição na realização desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno e aos demais colegas do Departamento de

Fitopatologia da UFV, em especial: Adelica Xavier, Adriana Cheavegatti, Adriana Truta, Ailton Reis, Davi Teodoro, Débora Teixeira, Douglas Lau, Edgard Picoli, Edson Mizubuti, Elene Yamazaki, Enilton Santana, Iraildes Assunção, Júlio César, Lúcio Mauro, Luiz Artur, Marcelo Laia, Mina Kurozawa, Márcia Brandão, Miguel Angel, Lisiene, Raquel Melo, Raquel Pedrosa e Rodrigo Serpa, pela agradável convivência e pelo constante estímulo.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFV, pelo apoio.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Importância econômica, diversidade e classificação dos tospovírus ..	5
2.2. Estrutura da partícula, organização do genoma e expressão gênica dos tospovírus	8
2.3. Processo de infecção da planta hospedeira	11
2.4. Relações com o vetor.....	12
2.5. Controle de tospovírus	14
2.6. Caracterização molecular de genes que conferem resistência a fitopatógenos.....	16
CAPÍTULO 1	
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ACESSOS DE <i>Lycopersicon</i> spp. A TOSPOVÍRUS	22
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Obtenção e manutenção dos isolados virais	25
2.2. Avaliação da resistência de acessos de <i>Lycopersicon chilense</i> e <i>L. peruvianum</i>	26
2.3. Determinação da herança da resistência de <i>Lycopersicon peruvianum</i> PI 126928 e LA 444/1-19.....	28
2.4. Avaliação da resistência de acessos de <i>Lycopersicon hirsutum</i>	28

2.5. Determinação da herança da resistência de <i>Lycopersicon hirsutum</i> PI 134417	29
3. RESULTADOS	30
3.1. Avaliação da resistência de acessos de <i>Lycopersicon chilense</i> e <i>L. peruvianum</i>	30
3.2. Herança da resistência em <i>Lycopersicon peruvianum</i>	34
3.3. Avaliação da resistência de acessos de <i>L. hirsutum</i>	35
3.4. Herança da resistência de <i>Lycopersicon hirsutum</i> PI 134417 ao isolado TSAL do <i>Tomato chlorotic spotted virus</i>	38
4. DISCUSSÃO	41
CAPÍTULO 2	
CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE ALELOS DO LOCO Sw-5 PROVENIENTES DE <i>Lycopersicon</i> spp.	46
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Amplificação dos alelos do loco Sw-5	51
2.2. Clonagem dos alelos do loco Sw-5	53
2.3. Caracterização parcial dos alelos do loco Sw-5 mediante digestão enzimática	54
2.4. Seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes	54
2.5. Análise das seqüências	57
3. RESULTADOS	58
3.1. Amplificação dos alelos do loco Sw-5	58
3.2. Caracterização parcial dos alelos do loco Sw-5 mediante digestão enzimática	60
3.3. Clonagem e caracterização molecular de alelos do loco Sw-5	60
4. DISCUSSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

RESUMO

LIMA, Gaus Silvestre de Andrade. D.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2001. **Resistência a tospovírus, clonagem e caracterização molecular de alelos do loco Sw-5 em espécies de *Lycopersicon*.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Acelino Couto Alfenas.

O presente trabalho objetivou: 1) avaliar a resistência de acessos de *Lycopersicon* spp. a tospovírus; 2) estudar a herança da resistência em algumas dessas fontes e 3) clonar e caracterizar molecularmente alelos do loco Sw-5 provenientes de *Lycopersicon* spp. Plantas de 12 acessos de tomateiro, pertencentes às espécies *L. peruvianum*, *L. chilense* e *L. hirsutum* foram inoculadas com cinco isolados de tospovírus, pertencentes às espécies TSWV, TCSV, CSNV e GRSV. A reação das plantas foi avaliada periodicamente por 30 dias. Ao final desse período, as plantas assintomáticas foram confirmadas como resistentes, mediante DAS-ELISA. A resistência na maioria dos materiais foi de amplo espectro (efetiva contra todos isolados), porém em alguns casos a resistência foi do tipo isolado-específica. Os materiais mais promissores foram os acessos PI 126928, LA 444/1, LA 371 e PI 126944 de *L. peruvianum* e LA 130 e LA 2753 de *L. chilense*. Esses materiais constituem fontes de

resistência alternativas para o manejo das tospoviroses do tomateiro. O estudo de herança da resistência em *L. hirsutum* PI 134417 indicou que a resistência nessa fonte é condicionada por dois genes independentes, um dominante e um recessivo. Num teste de alelismo, o gene dominante segregou independentemente do gene *Sw-5*, indicando que são genes distintos. Em *L. peruvianum* PI 126928, a resistência segregou como uma característica condicionada por dois ou mais genes dominantes não ligados. Na terceira etapa do trabalho, comparou-se o nível de conservação de alelos do loco *Sw-5* em *Lycopersicon* spp. Os alelos foram obtidos mediante PCR de longo alcance, utilizando-se o sistema ELONGASETM (Gibco-BRL) para amplificação. Nas reações de amplificação foram utilizadas três combinações de oligonucleotídeos desenhados com base na seqüência do gene *Sw-5*. Como molde foi utilizado DNA extraído de plantas cuja reação a tospovírus já era conhecida. Foram obtidos 16 alelos do loco *Sw-5*, provenientes de quatro espécies do gênero *Lycopersicon*. Após uma pré-caracterização mediante clivagem com enzimas de restrição, 10 clones foram selecionados para seqüenciamento. A análise de seqüência dos alelos revelou identidade de nucleotídeos superior a 91% para a ORF completa. Quando a comparação foi realizada para os diferentes domínios que compõem o gene *Sw-5*, observou-se que as maiores divergências residem nas extremidades 5' e 3' do gene. A comparação entre as proteínas codificadas pelo alelo *Sw-5*¹ (confere resistência) e seu alelo *sw-5*² (confere suscetibilidade) revelou 53 substituições ao nível de aminoácidos. Destas substituições, 14 são não-sinônimas e se concentram na extremidade amino e nas LRR, indicando o provável envolvimento dessas regiões na especificidade da resistência. A análise funcional dos alelos do loco *Sw-5* e a construção de quimeras entre os alelos *Sw-5* e *sw-5*² estão em andamento e auxiliarão a estabelecer as bases moleculares da resistência do tomateiro a tospovírus.

ABSTRACT

LIMA, Gaus Silvestre de Andrade. D.S., Universidade Federal de Viçosa, January 2001. **Resistance to tospovirus, cloning and molecular characterization of Sw-5 alleles from different *Lycopersicon* species.** Advisor: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee members: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Acelino Couto Alfenas.

Lycopersicon peruvianum, *L. chilense* and *L. hirsutum* germplasm was inoculated with five isolates from the tospovirus species *Tomato spotted wilt virus*, *Tomato chlorotic spot virus*, *Chrysanthemum stem necrosis virus*, and *Groundnut ringspot virus*. Several introductions showed resistance to all isolates. However, in some cases, resistance isolate-specific was also observed. PI 126928, LA 444/1, LA 371 and PI 126944 of *L. peruvianum* and LA 130 and LA 2753 of *L. chilense* were the most resistant materials. Inheritance studies showed that two independent genes, one dominant and one recessive, control the PI 134417 resistance. Allelism tests revealed that this dominant gene is not an allele of the Sw-5 locus. The resistance derived from PI 126928 segregated as a trait controlled by two or more non-linked dominant genes. Sixteen alleles of the Sw-5 locus were PCR-amplified from four *Lycopersicon* species, cloned and sequenced. The alleles possess more than

91% of identity at nucleotide level; the largest divergence was observed in the 5' and 3' extremities. Sequence comparisons between the resistance allele *Sw-5¹* and the susceptible allele *Sw-5²*, revealed 53 amino acid substitutions; fourteen substitutions are non-synonymous and located at the amino and carboxi terminus of the protein. The functional analysis of the other alleles and the construction of chimeras between *Sw-5¹* and *Sw-5²* will allow to identify the protein region involved in the resistance specificity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os tospovírus estão entre os vírus de maior importância para a agricultura mundial, provocando perdas significativas em várias culturas, sobretudo em hortaliças. No Brasil, considerando-se a cultura do tomateiro, são estimadas perdas que variam de 30 a 100% da produção (NAGATA *et al.*, 1995; POZZER *et al.*, 1996; FAJARDO *et al.*, 1997). As perdas tendem a ser mais elevadas em regiões em que predominam altas temperaturas e escassez de chuvas, condições que favorecem a multiplicação e a dispersão dos vetores, insetos da ordem Thysanoptera (De ÁVILA, 1993).

Em tomateiro, a doença provocada pelos tospovírus, é conhecida como vira-cabeça (De ÁVILA, 1993). Os sintomas observados variam muito, dependendo do isolado, do hospedeiro e das condições ambientais. De um modo geral, verifica-se bronzeamento nas folhas, mosaico, deformação foliar, manchas em anéis sobre folhas e frutos, necrose do caule e das folhas, nanismo e até mesmo morte de plantas (GERMAN *et al.*, 1992; NAGATA *et al.*, 1995; POZZER *et al.* 1996).

O *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) foi considerado, por muitos anos, o único membro de um grupo que apresenta características únicas entre os vírus que infectam plantas (PETERS e GOLDBACH, 1993). No entanto, pesquisas independentes demonstraram semelhanças entre o TSWV e membros da família Bunyaviridae (FRANCKI *et al.*, 1991; MURPHY *et al.*, 1995). Atualmente os *Tospovirus* representam o quinto gênero desta família. Os outros quatro

gêneros são constituídos por vírus que infectam exclusivamente animais (VAN POELWIJK *et al.*, 1996). Atualmente, cerca de 12 espécies são reconhecidas ou propostas nesse gênero (VAN ROGERMORTEL *et al.*, 2000).

No Brasil, seis espécies já foram relatadas: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), sendo que as quatro primeiras espécies podem infectar o tomateiro (De ÁVILA, 1993; COLLARICIO, 2000). A importância relativa de cada uma dessas espécies varia de acordo com a região geográfica considerada, porém recentes levantamentos têm evidenciado a predominância do GRSV em tomateiros em várias regiões do país (BEZERRA *et al.*, 1999; POZZER *et al.*, 1999; LIMA, 2000).

Vários fatores dificultam o controle dos tospovírus, principalmente a ampla gama-de-hospedeiros, que para algumas espécies pode ser superior a 800 espécies de plantas (JAHN *et al.*, 2000). Este fato dificulta a adoção de medidas de erradicação e de outras medidas que visam reduzir a fonte de inóculo, como a erradicação de plantas daninhas, destruição de restos de culturas, etc. O controle químico dos trips nem sempre é eficiente e, ou, economicamente inviável. Portanto, a resistência genética tem sido considerada a melhor estratégia para o manejo dessas viroses na cultura do tomateiro (STEVENS *et al.*, 1992; KUMAR *et al.*, 1993; De ÁVILA, 1993; STEVENS *et al.*, 1994; ROSELLÓ *et al.*, 1999).

Resistência ao TSWV tem sido relatada em algumas espécies do gênero *Lycopersicon*, principalmente em *L. peruvianum* (KUMAR *et al.*, 1993; STEVENS *et al.*, 1994; ROSELLÓ *et al.*, 1999). Todavia, não tem sido fácil incorporar essa resistência em variedades comerciais, devido à incompatibilidade de cruzamentos entre *L. esculentum* e *L. peruvianum* e à associação da resistência com características agronômicas indesejáveis. Além disso, muitas vezes, a resistência identificada é isolado-específica.

Na década de 1940, resistência de amplo espectro ao TSWV foi identificada em *L. peruvianum*. Essa resistência foi incorporada em *L. esculentum* mediante o método de retrocruzamentos, resultando no desenvolvimento da cultivar Stevens (STEVENS *et al.*, 1992). Posteriormente, foi demonstrado que essa resistência era efetiva contra outras espécies de

tospovírus que infectam o tomateiro (STEVENS *et al.*, 1992; BOITEUX e GIORDANO, 1993; LAU, 2000). O estudo de herança indicou que a resistência incorporada em ‘Stevens’ é condicionada por um único gene dominante, denominado Sw-5 (STEVENS *et al.*, 1992).

A natureza inespecífica da resistência tornou o gene Sw-5 a principal alternativa no melhoramento do tomateiro visando resistência a tospovírus (CHO *et al.*, 1996). Este gene vem sendo incorporado em vários cultivares de tomate industrial e de mesa (CHO *et al.*, 1996; ROSELLÓ *et al.*, 1998). A expansão da área cultivada com variedades contendo o gene Sw-5 pode resultar na seleção de estirpes capazes de suplantam a resistência conferida por esse gene. Desta maneira, a identificação de fontes adicionais de resistência a tospovírus é de grande importância para o manejo dessas viroses.

O gene Sw-5 codifica para uma proteína de 1246 aminoácidos que tem similaridade com várias proteínas envolvidas na resistência de plantas a doenças, incluindo as proteínas Mi e I2 do tomateiro que conferem resistência a *Meloidogyne* spp. e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, respectivamente e RPM1 de *Arabidopsis*, que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000). Essas proteínas apresentam domínios que contêm repetições ricas no aminoácido leucina (LRR's, “leucine rich repeat”) e sítios de ligação a nucleotídeos trifosfatados (NBS, “nucleotide binding site”). Tem sido proposto que os domínios LRR atuam em interações proteína-proteína (KOBÉ e DEISENHOFER, 1995; ELLIS *et al.*, 2000a), o que sugere que a proteína Sw-5 pode se ligar diretamente ao produto de avirulência do patógeno ou interagir com outras proteínas do hospedeiro que integram as vias de transdução de sinais que conduzem à reação de hipersensibilidade e à ativação de outras respostas de defesa. Os domínios NBS têm sido relatados em várias proteínas que atuam como sinalizadores celulares (ELLIS *et al.*, 2000a) e sua presença sugere que a ligação a nucleotídeos trifosfatados (ATP, GTP) seja essencial para a atividade da proteína Sw-5. A clonagem de outros alelos do loco Sw-5 permitirá um estudo mais detalhado dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade dessa proteína.

O presente trabalho teve como objetivos: 1) avaliar acessos selvagens de *Lycopersicon* spp. quanto à resistência a tospovírus; 2) estudar a herança da resistência presente em algumas dessas fontes e 3) clonar e caracterizar molecularmente homólogos do gene *Sw-5* provenientes de diferentes acessos de *Lycopersicon* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica, diversidade e classificação dos tospovírus

Em tomate, a primeira descrição de uma doença causada por tospovírus foi feita por BRITTLEBANK (1919) na Austrália. O autor denominou-a “spotted wilt of tomato”. A associação de um vírus à doença foi feita por SAMUEL *et al.* (1930), que denominaram o agente etiológico de *Tomato spotted wilt virus* – (TSWV).

Por muitos anos o TSWV foi considerado como um vírus restrito às regiões tropicais e subtropicais. Entretanto, na década de 1980, devido à introdução no Hemisfério Norte do vetor *Frankliniella occidentalis*, o TSWV disseminou-se rapidamente em hortaliças e plantas ornamentais cultivadas nos Estados Unidos, Canadá e posteriormente na Europa (POZZER *et al.*, 1996). Atualmente o patógeno ocorre em todos os continentes (GERMAN *et al.*, 1992; ROSELLÓ *et al.*, 1996; POZZER *et al.*, 1996).

No Brasil, o TSWV foi descrito pela primeira vez em 1937 por Silberschmidt, em fumo (POZZER *et al.*, 1996). Em tomateiro, a doença causada por tospovírus é tradicionalmente conhecida como “vira-cabeça”, sendo

uma das principais doenças da cultura (LOPES e SANTOS, 1994). Os prejuízos em tomate têm sido elevados pelo fato das principais cultivares de tomate de mesa e para processamento industrial serem altamente suscetíveis ao vírus. Perdas variando de 30% a 100% têm sido descritas para a cultura do tomateiro no Brasil (POZZER *et al.*, 1996, FAJARDO *et al.*, 1997). Maiores perdas devido à doença são observadas nos períodos mais quentes e secos do ano, condições que favorecem a multiplicação e a dispersão do tripes vetor (LOPES e SANTOS, 1994).

Algumas espécies de tospovírus podem apresentar uma gama de hospedeiros muito ampla, como por exemplo, o TSWV, para o qual são relatadas mais de 800 espécies (JHAN *et al.*, 2000). Entre estas espécies estão incluídas muitas culturas de importância econômica, como pimentão, fumo, batata, alface, berinjela, amendoim, mamão, amendoim, além de várias espécies de plantas ornamentais (GERMAN *et al.*, 1992; POZZER *et al.*, 1996; ROSELLÓ *et al.*, 1996; EDWARDSON e CHRISTIE, 1997; GARCIA *et al.*, 2000). As gamas de hospedeiros do GRSV, TCSV e CSNV, também são consideradas amplas (BEZERRA *et al.*, 1999; POZZER *et al.*, 1999).

Por várias décadas, o TSWV foi considerado como um vírus com características únicas, não relacionado com nenhum outro vírus de plantas (GOLDBACH E PETERS, 1994). No entanto, pesquisas independentes demonstraram a semelhança, principalmente com relação à morfologia da partícula, organização genômica e expressão de proteínas, do TSWV com membros da família Bunyaviridae (MILNE e FRANCKI, 1984; De HAAN *et al.*, 1989; FRANCKI *et al.*, 1991; MURPHY *et al.*, 1995). Esta

família apresentava até então quatro gêneros cujos membros infectam exclusivamente animais (*Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Hantavirus*). A caracterização molecular do TSWV levou à proposta de criação de um quinto gênero (*Tospovirus*), sendo o TSWV considerado a espécie-tipo deste gênero (De HAAN *et al.*, 1990).

A utilização de ELISA no estudo da diversidade do TSWV revelou que os isolados apresentavam características sorológicas distintas, as quais poderiam ser utilizadas em estudos taxonômicos e filogenéticos. A análise dos diferentes isolados mediante utilização de antissoros policlonais contra a proteína N e de antissoros monoclonais contra as proteínas N, G1 e G2 resultou no reconhecimento de três serogrupos: I, II e III (De ÁVILA *et al.*, 1990). No serogrupo II, distinguiram-se dois serotipos (De ÁVILA *et al.*, 1990).

A caracterização molecular mais detalhada dos tospovírus levou à separação dos isolados pertencentes a estes serogrupos em espécies, sendo a sequência de aminoácidos codificada pelo gene do nucleocapsídeo (N) o principal critério utilizado nessa distinção. Atualmente, considera-se que isolados com identidade igual ou superior a 90% sejam agrupados na mesma espécie (RESENDE, 1995). No entanto, a sequência do gene N não é o único fator considerado na definição de espécies de tospovírus. Outras características importantes incluem: relacionamento sorológico, utilizando-se antissoro para a proteína N, especificidade de transmissão por vetores, sintomatologia e gama de hospedeiros (De ÁVILA, 1993; ROSELLÓ *et al.*, 1996).

Baseado em tais critérios, De ÁVILA *et al.* (1993c) propuseram, além de TSWV, três novas espécies denominadas *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Impatiens necrotic spot virus* (INSV). Posteriormente foram descritas as espécies *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) (HEINZE *et al.*, 1995), *Watermelon silver mottle virus* (WSMV) (YEH e CHANG, 1995), *Watermelon bud necrosis virus* (WBNV) (JAIN *et al.*, 1998), *Iris yellow spot virus* (IYSV) (CORTÊS *et al.*, 1998), *Peanut bud necrosis virus* (PBNV) (SATYANARAYANA *et al.*, 1996), *Peanut yellow spot virus* (PYSV) (SATYANARAYANA *et al.*, 1998), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) (BEZERRA *et al.*, 1999), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (BEZERRA *et al.*, 1999) e *Melon yellow spot virus* (MYSV) (KATO *et al.*, 2000).

NAGATA *et al.* (1995) realizaram um levantamento para determinar a distribuição geográfica das espécies de tospovírus associadas ao tomateiro em vários estados do Brasil. Os autores verificaram que em São Paulo, Santa Catarina e sul de Minas Gerais, predominaram TCSV e GRSV. Situação inversa foi observada no Paraná e no Distrito Federal, onde predominou TSWV. Em Pernambuco, apenas GRSV foi encontrado e no Rio Grande do Sul, apenas TCSV. Levantamentos recentes indicam que o GRSV vem se disseminando em diversas regiões do país, podendo ser considerada como a espécie de tospovírus mais importante em tomateiros no Brasil (BEZERRA *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2000). O CSNV, que também pode infectar o tomateiro, foi relatado apenas na região Sudeste (EIRAS *et al.*, 1999; COLARICCIO *et al.*, 2000).

2.2. Estrutura da partícula, organização do genoma e expressão gênica dos tospovírus

Os tospovírus são os únicos vírus de plantas conhecidos que apresentam partículas envolvidas por um envelope lipídico e morfologia aproximadamente esférica (80 x 110nm) (GERMAN *et al.*, 1992). O envelope é originário do sistema de membranas do hospedeiro (planta ou vetor) e apresenta, embebidas na matriz lipídica, duas glicoproteínas codificadas pelo genoma viral (KITAJIMA *et al.*, 1992).

No interior do envelope encontram-se três RNAs de fita simples, que compõem o genoma viral. Os RNA's são denominados de acordo com seus tamanhos relativos: RNA L ("long", 8,9 kb), RNA M ("medium", 5,4 kb) e RNA S ("short", 2,9 kb) (MOHAMED, 1981; De HAAN *et al.*, 1991). Na partícula são encontradas quatro proteínas estruturais: a proteína N, de 28,8 kDa, que está fortemente associada aos RNAs genômicos, formando os nucleocapsídeos (GERMAN *et al.*, 1992). Ligadas aos nucleocapsídeos encontram-se cerca de 10 a 20 cópias da proteína L, de 331,5 kDa (ROSELLÓ *et al.*, 1996). Duas glicoproteínas estruturais (G1 e G2) estão associadas ao envelope lipídico (MOHAMED, 1981).

As extremidades 3' e 5' dos três RNAs são complementares entre si. Esta característica faz com que os RNA's assumam uma forma pseudocircular mais estável, denominada "cabo de panela" (PETERS *et al.*, 1991; KORMELINK *et al.*, 1992a).

Até o momento, apenas dois isolados de tospovírus tiveram seus genomas completamente seqüenciados, o isolado brasileiro BR01 (TSWV) e o isolado holandês NL-07 (INSV). Esses dois genomas servem como modelo para o estudo de expressão e regulação gênica de tospovírus em células vegetais (ROSSELÓ *et al.*, 1996).

O RNA L apresenta apenas uma ORF, de polaridade negativa (De HAAN *et al.*, 1991; VAN POELWIJK *et al.*, 1995) e, portanto, a fita complementar deve ser copiada para que o processo de tradução se realize. Os RNAs M e S utilizam uma estratégia de expressão ambisenso e apresentam duas ORF's cada um. O RNA M codifica, no sentido viral, uma proteína não-estrutural denominada NSm, de 33,6 kDa, e no sentido complementar um polipeptídeo de 127 kDa que é processado em duas glicoproteínas (G1 e G2) (KORMELINK *et al.*, 1992b). O RNA S codifica no sentido viral a proteína NSs, de 52,4 kDa e, no sentido complementar, a proteína N, de 28,8 kDa (De HAAN *et al.*, 1991; KORMELINK *et al.*, 1991).

As proteínas codificadas pelos RNAs M e S são traduzidas a partir de RNA's subgenômicos (KORMELINK *et al.*, 1992b). Nesses casos, antes da tradução, devem ocorrer a transcrição e o processamento dos mRNAs. O processamento inclui a incorporação de uma seqüência (“cap”) removida da extremidade 5' dos RNAs mensageiros do hospedeiro, um processo conhecido como “cap-snatching” (KORMELINK *et al.*, 1992a). As seqüências removidas correspondem ao sítio de ligação dos ribossomos. Dessa maneira, a tradução dos mRNAs do hospedeiro é enormemente comprometida, pois os RNAs que não apresentam essas seqüências não são traduzidos.

As funções da maioria das proteínas codificadas pelos tospovírus já foram determinadas. A proteína L é a replicase viral (RNA polimerase

dependente de RNA) (ADKINS *et al.*, 1995). Outra função atribuída à proteína L é o processo de roubo da capa, ou seja, a enzima cliva as seqüências 5' dos mRNAs do hospedeiro e as liga aos mRNAs virais (KORMELINK *et al.*, 1992c). A comparação da seqüência de aminoácidos das polimerases de TSWV e INSV revelou vários domínios com homologia com outros membros da família *Bunyaviridae* (De HAAN, *et al.*, 1991; VAN POELWIJK *et al.*, 1997).

As proteínas G1 (75 kDa) e G2 (46 kDa) são produzidas a partir de um peptídeo precursor, de 127,4 kDa em TSWV (KORMELINK *et al.*, 1992b) e 124,9 kDa em INSV (LAW *et al.*, 1992). Essas proteínas estão envolvidas na formação do envelope (RESENDE *et al.*, 1991). As proteínas G1 e G2 aparentemente estão envolvidas na aquisição do vírus pelo vetor (BANDLA *et al.*, 1998; KIKKERT *et al.*, 1998). Isso pôde ser sugerido a partir da observação que tospovírus, após seguidas inoculações artificiais no hospedeiro, tendem a perder seu envelope e a capacidade para codificar as glicoproteínas (RESENDE *et al.*, 1991). Isolados que perderam o envelope deixam de ser transmitidos pelo vetor, mas não perdem a infectividade quando inoculados artificialmente. A inspeção da estrutura primária da glicoproteína G2 de INSV revelou a presença de um domínio de ligação à membrana celular de tripes (LAW e MOYER, 1990) e TSWV (KORMELINK *et al.*, 1992b). Esta região pode representar o sítio pelo qual o vírion interage com o inseto durante as fases iniciais do processo de aquisição (KORMELINK *et al.*, 1992b).

A proteína NSm é a provável proteína de movimento célula a célula (KORMELINK *et al.*, 1992c; STORMS *et al.*, 1995). Esta proteína não é encontrada em outros membros da família *Bunyaviridae*. Estudos de imunolocalização demonstraram que esta proteína encontra-se associada a agregados de nucleocapsídeo e a plasmodesmas (KORMELINK *et al.*, 1994). Nos plasmodesmas de células infectadas é observada a formação de túbulos, os quais são imunomarcados positivamente para a proteína NSm (STORMS *et*

al., 1995). O mesmo fato também ocorre em protoplastos (KIKKERT *et al.*, 1997). Esses e outros resultados sugerem que esta proteína executa ou auxilia o movimento de nucleocapsídeos através dos plasmodesmas (KORMELINK *et al.*, 1994; STORMS *et al.*, 1995). A hipótese de que nucleocapsídeos, e não vírions, sejam transportados através dos plasmodesmas, pode ser sugerida devido ao fato de que mutantes que não apresentam envelope são capazes de infectar sistemicamente a planta hospedeira (RESENDE *et al.*, 1991).

A proteína N é a proteína que se associa aos RNAs genômicos formando os nucleocapsídeos. Além disso, a proteína N parece ter um papel decisivo no controle da transcrição/replicação.

A proteína NSs é a única cuja função ainda não foi determinada. Porém, sabe-se que esta proteína acumula-se tanto em células do inseto vetor (ULLMAN *et al.*, 1995) quanto em células vegetais, podendo estar associada à replicação viral (LAWSON *et al.*, 1996; KIKKERT *et al.*, 1997).

A comparação entre os genomas do TSWV e INSV, bem como de seus produtos gênicos, foi realizada por KORMELINK *et al.* (1992b). Entre as várias proteínas, a polimerase (proteína L) é a mais conservada (84 % de homologia de sequência). Ambas as proteínas codificadas pelo RNA S são menos conservadas (N, 70 % e NSs, 69 %). Uma comparação mais detalhada entre as proteínas L de TSWV e INSV revelou que a polimerase do INSV é 10 resíduos de aminoácidos mais curta (VAN POELWIJK *et al.*, 1996).

A comparação do genoma dos tospovírus com o de outros membros de Bunyaviridae tem fornecido importantes evidências a respeito da evolução dos tospovírus. O fato do gênero *Bunyavirus* ser mais relacionado com *Tospovirus* do que com *Hantavirus*, considerando-se o RNA L, sugere que a adaptação de *Tospovirus* à planta hospedeira teria ocorrido há muito tempo (De HAAN *et al.*, 1991). No entanto, considerando a natureza ambisenso do RNA S, os *Tospovirus* parecem mais relacionados com *Phlebovirus*, uma vez que para os demais membros da família o RNA S é de polaridade

negativa (MURPHY *et al.*, 1995; VAN POELWIJK *et al.*, 1996).

2.3. Processo de infecção da planta hospedeira

Após a entrada na célula, as partículas são desenvolvidas, provavelmente por enzimas presentes nos lisossomos. A proteína do nucleocapsídeo é desagregada dos RNAs genômicos, tornando-os aptos à transcrição pela polimerase viral. A polimerase pode então sintetizar os mRNAs. Após a adição da capa, mediante o processo de “cap-snatching” os mRNAs são traduzidos, originando as proteínas estruturais e não-estruturais, essenciais para completar o ciclo de infecção (POZZER *et al.*, 1996).

Não há resultados conclusivos em relação ao controle temporal da transcrição e da replicação viral. Entretanto, pode ser especulado que esses processos se assemelhem, em linhas gerais, ao que ocorre com outros vírus que apresentam genoma constituído por RNA de fita simples sentido negativo (ROSELLÓ *et al.*, 1996). Nesses casos a polimerase atua como replicase ou transcriptase dependendo da quantidade de proteína N no citoplasma. Assim, quando há uma pequena quantidade de N, como ocorre no início da infecção, a polimerase viral atua como transcriptase, sintetizando mais mRNA do que RNA genômico. Quando o nível de proteína N no citoplasma se eleva, a polimerase passa a atuar como replicase, aumentando a síntese do RNA viral (GIELEN *et al.*, 1991). Os RNAs genômicos seriam encapsidados pela proteína N, formando os nucleocapsídeos, os quais poderiam ser transportados através dos plasmodesmas com a participação da proteína NSm, infectando células vizinhas. De acordo com POZZER *et al.* (1996), os nucleocapsídeos poderiam tomar uma via alternativa na célula vegetal, ou seja, seguiriam para o complexo de Golgi e/ou retículo endoplasmático, onde seriam envelopados. Nesse caso os vírions estariam prontos para serem adquiridos pelo vetor e transmitidos para outras plantas, completando assim o processo de infecção.

2.4. Relações com o vetor

Os tospovírus são transmitidos de maneira persistente por insetos da ordem Thysanoptera, vulgarmente conhecidos como tripes (SAKIMURA, 1962; PALIWAL, 1974). O inseto adquire o vírus principalmente no primeiro ou, ocasionalmente, no segundo estágio larval (WIJKAMP *et al.*, 1993). Em condições de campo a transmissão só se inicia quando o inseto atinge o estágio adulto (SAKIMURA, 1962). O inseto na fase adulta não adquire o vírus devido a uma barreira histológica localizada no intestino, que aparentemente impede a fixação dos vírions (ULLMAN, *et al.*, 1992; MEDEIROS e GERMAN, 2000).

Pelo menos nove espécies de tripes pertencentes aos gêneros *Thrips*, *Scirtothrips* e *Frankliniella* já foram descritas como vetores de tospovírus (ROSELLÓ *et al.*, 1996; MOUND, 1996). Até a década de 1980, *T. tabaci* era considerada a principal espécie vetora, devido principalmente à sua ampla distribuição geográfica. A partir dessa década *F. occidentalis* tornou-se o principal vetor em decorrência de sua rápida disseminação no Hemisfério Norte (GOLDBACH e PETERS, 1994). Outras espécies que merecem destaque devido as suas importâncias como vetores de tospovírus são *F. schultzei* e *F. fusca* (ROSELLÓ *et al.*, 1996).

No Brasil dispõem-se de poucos dados sobre a distribuição geográfica e importância relativa das diferentes espécies de tripes vetores de tospovírus. Porém, acredita-se que essa distribuição seja muito influenciada pelas condições ambientais e pelo tipo de vegetação encontrada. PAVAN *et al.* (1996) relataram *F. schultzei* como a única espécie vetora de TSWV e TCSV na cultura do tomateiro, na região de Botucatu, SP. De acordo com FAJARDO *et al.* (1997) provavelmente essa espécie é o vetor mais importante no país.

A eficiência de transmissão dos tospovírus depende de vários fatores, podendo ser citados, dentre outros, a espécie, o ecotipo e o estágio de desenvolvimento do vetor, o isolado viral e a planta hospedeira considerada. De um modo geral há uma grande variação na eficiência de transmissão dos tospovírus pelas diferentes espécies de *F. occidentalis* é de 85%, caindo para 66% para TSWV, 28% para TCSV e 10% para GRSV. *F. schultzei* transmite mais eficientemente TCSV (38%) do que GRSV (16%) e TSWV (14%). Os

autores demonstraram também a baixa eficiência de transmissão da espécie *T. tabaci*, que nas mesmas condições foi capaz de transmitir apenas o TSWV, ainda assim com uma eficiência considerada baixa (10%). Com relação ao CSNV, BEZERRA *et al.* (1999) verificaram que o vírus foi transmitido por *F. occidentalis* e *F. schltzei*, mas não por *T. tabaci*.

Técnicas como ELISA têm sido utilizadas para acompanhar a concentração de vírus no corpo do inseto. Logo após a ingestão, grande parte do vírus é eliminada através do intestino. Em seguida, a quantidade de vírus aumenta progressivamente até o momento da metamorfose, quando cai repentinamente. Na fase adulta, a concentração de vírus volta a aumentar consideravelmente (ULLMAN *et al.*, 1993; WIJKAMP *et al.*, 1993). Quando chega ao intestino do inseto o vírus adere-se à parede, multiplica-se nos tecidos adjacentes e transloca-se através da hemolinfa, até chegar às glândulas salivares, onde se acumula. Durante o processo de alimentação o vírus é inoculado nas plantas, juntamente com a saliva (ULLMAN *et al.*, 1993; WIJKAMP *et al.*, 1993).

Estudos de microscopia eletrônica têm sugerido que os eventos envolvidos na aquisição do vírus pelo vetor são característicos de endocitose mediada por receptor (BANDLA *et al.*, 1998; MEDEIROS e GERMAN, 2000). Várias evidências sugerem que as glicoproteínas G1 e G2 interagem especificamente com receptores localizados nas membranas das células do intestino do inseto (BANDLA *et al.*, 1998; KIKKERT *et al.*, 1998). KIKKERT *et al.* (1998) identificaram uma proteína de 94 kDa, conservada em duas espécies vetoras (*F. occidentalis* e *T. tabaci*). De acordo com os autores, esta proteína seria o receptor das partículas de TSWV, mediante interação específica com a glicoproteína G2. BANDLA *et al.* (1998), trabalhando com a interação *F. occidentalis* - TSWV chegaram a resultados distintos. Os autores identificaram uma proteína de 50 kDa que provavelmente interage com as duas glicoproteínas.

Resultados obtidos por MEDEIROS e GERMAN (2000) reforçam a hipótese que a proteína de 50 kDa é o determinante de especificidade na interação com G1 e G2. Os autores clonaram e caracterizaram o cDNA que codifica para essa proteína, que é um homólogo de receptores arilforina. Esta proteína é expressa em altos níveis nas larvas e em baixos níveis nos adultos e

apresenta similaridade com β -integrina, o receptor para *Hantavirus* (MEDEIROS e GERMAN, 2000).

A primeira evidência de que os tospovírus replicam no inseto vetor foi obtida por WIJKAMP *et al.* (1993). Os autores utilizaram a técnica de “western blotting” para demonstrar o acúmulo das proteínas N e NS_S do TSWV no corpo de *F. occidentalis*. Partículas virais foram observadas nas glândulas salivares, nos ductos das glândulas salivares e nas células musculares. A multiplicação do vírus no vetor foi confirmada pelo uso de culturas de células de tripes (NAGATA *et al.*, 1997).

2.5. Controle de tospovírus

De acordo com De ÁVILA (1993) vários fatores dificultam o controle das doenças causadas por tospovírus na cultura do tomateiro. A ampla gama de hospedeiros torna difícil a adoção de medidas fitossanitárias como erradicação de hospedeiros alternativos, isolamento cultural e determinação de calendários de plantio. O controle do vetor pelo uso de inseticidas é uma opção interessante, uma vez que a transmissão pelo inseto é do tipo circulativa e o vetor somente adquire o vírus no estágio larval, sendo capaz de transmiti-lo apenas na fase adulta. Além disso, apenas o adulto é alado e a dispersão das ninfas pelo vento não é muito eficiente (De ÁVILA, 1993; ROSELLÓ *et al.*, 1996). No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que a aplicação de inseticidas com o intuito de se controlar os tripes deve ser feita com cautela, devido ao risco de seleção de populações resistentes (BROADBENT e PREE, 1997). Além disso, o controle químico do vetor é dificultado pela sua ampla gama de hospedeiros e pelo fato de, muitas vezes, ocuparem partes da planta pouco acessíveis aos

inseticidas, como os órgãos florais (ROSELLÓ *et al.*, 1996).

Devido a estas dificuldades, a resistência genética tem sido apontada como a estratégia mais promissora no controle das tospoviroses (STEVENS *et al.*, 1992; De ÁVILA, 1993; CHO *et al.*, 1996; ROSELLÓ *et al.*, 1998; 1999). Os primeiros trabalhos em busca de fontes de resistência a tospovírus no germoplasma de *Lycopersicon* foram realizados nas décadas de 1930 e 1940 e resultaram na identificação de acessos resistentes de *L. pimpinellifolium* (SAMUEL *et al.*, 1930) e *L. esculentum* (HOLMES, 1948). FINLAY (1953) demonstrou que a resistência nessas fontes era do tipo isolado-específica, o que as tornou desinteressantes para programas de melhoramento.

A busca de resistência a tospovírus foi estendida a outras espécies não cultivadas de *Lycopersicon*, incluindo *L. peruvianum*, *L. chilense*, *L. hirsutum*, *L. glabratum*, *L. chimielewskii*, *L. pennellii*, entre outras (STEVENS *et al.*, 1992; KUMAR *et al.*, 1993). Em alguns casos resistência tem sido identificada, todavia a incorporação dessa resistência em variedades comerciais tem sido difícil, principalmente devido à falta de compatibilidade de cruzamentos entre o tomateiro cultivado com espécies selvagens e à associação da resistência com características agrônomicas indesejáveis (THOMPSON e VAN ZIJL, 1996).

Resistência de amplo espectro ao TSWV foi identificada em *L. peruvianum* e incorporada em *L. esculentum*, mediante retrocruzamentos, resultando numa cultivar denominada Stevens (STEVENS *et al.*, 1992; THOMPSON e VAN ZIJL, 1996). Posteriormente, foi demonstrado que a resistência presente em 'Stevens' era condicionada por um único gene dominante, denominado Sw-5 (STEVENS *et al.*, 1992). Vários estudos demonstraram que a resistência mediada por Sw-5 é eficiente contra as espécies de tospovírus que infectam o tomateiro (De ÁVILA, 1993; BOITEUX e GIORDANO, 1993; ROSELLÓ *et al.*, 1998; LAU, 2000).

O caráter não específico da resistência conferida por Sw-5 tornou este gene o mais utilizado em programas de melhoramento. Todavia, essa resistência pode ser parcialmente vencida na presença de elevadas populações de tripses vetor virulíferos (DÍEZ *et al.*, 1995; ROSELLÓ *et al.*, 1998) ou completamente suplantada por determinados isolados (LATHAM e JONES, 1998; LAU, 2000; STEVENS *et al.*, 1998; COLLARICIO *et al.*, 2000). Um outro

gene de resistência (*Sw-6*), também originário de *L. peruvianum*, foi recentemente identificado por ROSELLÓ *et al.* (1998). Este gene constitui uma alternativa para programas de melhoramento, embora tenha como desvantagens o fato de apresentar dominância incompleta e ter sua eficiência reduzida quando se realizam inoculações com tripes (ROSELLÓ *et al.*, 1998).

2.6. Caracterização molecular de genes que conferem resistência a fitopatógenos

A base genética de interações gene-a-gene começou a ser desvendada após os trabalhos de Flor que demonstraram que a resistência do linho à ferrugem (*Melampsora lini*) era consequência de uma interação entre genes correspondentes no patógeno e no hospedeiro. Os estudos de Flor forneceram a base teórica para a hipótese gene-a-gene de interação planta-patógeno e para a clonagem de genes de avirulência de patógenos e seus correspondentes genes de resistência de plantas.

De acordo com a hipótese gene-a-gene, o hospedeiro apresenta genes responsáveis pelo reconhecimento específico de fatores produzidos pelas diferentes raças do patógeno (genes *R*). Os fatores do patógeno, reconhecidos pelos produtos dos genes de resistência, são denominados de elicitores e os genes que os codificam, de genes de avirulência (*avr*). Tal reconhecimento dispara uma série de eventos, culminando na ativação de um conjunto de respostas de defesa, incluindo a reação de hipersensibilidade (HR). Portanto, o fenótipo da interação é uma característica dependente da constituição genética do patógeno e do hospedeiro. Quando os genes *R* e *avr* estão presentes na interação planta-patógeno o hospedeiro é resistente, ao passo que se um ou ambos os genes estão ausentes a interação resulta em doença. Esse tipo de interação tem sido observado para vários casos envolvendo patógenos biotróficos e hemibiotróficos (STASKAWICZ *et al.*, 1995).

Interações gene-a-gene têm sido interpretadas em termos de um modelo receptor-ligante, onde os produtos dos genes de resistência são receptores que especificamente detectam, direta ou indiretamente, o produto de avirulência correspondente do patógeno (CRUTE e PINK, 1996). Os modelos propostos sugerem que estas proteínas receptoras devem

desempenhar duas propriedades básicas: reconhecimento específico do patógeno e ativação de uma cascata de transdução de sinais que leva à expressão de genes envolvidos na resistência (ELLIS *et al.*, 2000a). Este modelo pode ser uma simplificação e o produto do patógeno reconhecido pode ser um complexo formado entre fatores do patógeno e do hospedeiro ou fatores apenas do patógeno (ELLIS *et al.*, 2000b). Vale salientar que até o momento a demonstração da interação direta entre os produtos dos genes *R* e *Avr* só foi realizada para as proteínas codificadas pelos genes *Pto* do tomateiro e *Xa21* do arroz. A proteína *Pto* interage com *AvrPto*, proteína codificada pelo gene *avrPto* de *Pseudomonas syringae* pv. Tomato (TANG *et al.*, 1996), enquanto a proteína *Xa21* interage com *AvrXa21*, produzida por raças de *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* que apresentam o gene *avrXa21* (BRYAN *et al.*, 2000).

Com a exceção dos genes *Avr* de origem viral, não se conhece exatamente as funções desempenhadas pelos genes *Avr* (GOPALAN *et al.*, 1996; LAECH e WHITE, 1996). A análise de seqüência desses genes revelou que os mesmos codificam para produtos sem características estruturais em comum. Existem evidências de que os genes *Avr* podem desempenhar papéis importantes na patogênese, uma vez que, em alguns casos, redução na patogenicidade é observada quando os genes *Avr* são mutados (KEARNEY e STASKAWICZ, 1990; SWARUP *et al.*, 1992; VAN GIJSEGEM *et al.*, 1995; DANGAL, *et al.*, 1995; GOPALAN *et al.*, 1996; LEACH e WHITE, 1996).

A clonagem e caracterização de genes que conferem resistência do tipo gene-a-gene revelou que, ao contrário dos genes *avr*, os produtos dos genes *R* apresentam domínios estruturais conservados. Esta conservação independe do patógeno e da planta hospedeira considerada. Tal fato sugere que as plantas utilizam um mecanismo geral de percepção e ativação de respostas de defesa contra patógenos (HAMOND-KOSACK e JONES, 1996; BENT, 1996). Em determinados aspectos, as respostas de defesa vegetal se assemelham à resposta imune de insetos e mamíferos. Algumas dessas semelhanças incluem a ativação da morte celular programada e a semelhança estrutural de algumas proteínas envolvidas na resposta de defesa contra patógenos (MICHELMORE e MEYERS, 1998; NOEL *et al.*, 1999).

De acordo com as características estruturais das proteínas codificadas, os genes *R* têm sido agrupados em quatro classes. Três dessas classes apresentam domínios constituídos por repetições ricas no aminoácido leucina (“leucine rich repeats”, LRR’s). Na classe que corresponde aos genes que conferem ao tomateiro resistência a *Cladosporium fulvum* (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* e *Cf-9*) as LRR são extracelulares, sendo as proteínas ancoradas à membrana plasmática por um domínio hidrofóbico. Situação semelhante ocorre com a classe representada pelo gene *Xa-21* do arroz, que confere resistência contra *X. campestris* pv. *oryzae*. No entanto, além das LRR extracelulares, a proteína *Xa21* apresenta um domínio transmembrana e um domínio cinase serina/treonina na porção citoplasmática. A classe mais abundante reúne proteínas *R* que além dos domínios LRR’s, apresentam um domínio de sítio de ligação a nucleotídeos trifosfatados (“nucleotide binding site”, NBS). Atualmente esta classe conta com pelo menos 15 genes já caracterizados (ELLIS *et al.*, 2000a; ELLIS *et al.*, 2000b).

Estruturalmente, as repetições ricas em leucina são domínios de aproximadamente 24 aminoácidos, repetidos em série, contendo leucina ou outros aminoácidos hidrofóbicos a intervalos regulares, podendo também apresentar prolínas e asparaginas espaçadas entre as repetições de leucina (BENT *et al.*, 1994). A seqüência consenso que caracteriza o domínio LRR é LxxLxLxx, onde “L” representa leucina ou outro resíduo hidrofóbico. Até o momento nenhuma proteína de resistência foi cristalizada e, portanto, as inferências estruturais são efetuadas por analogia com outras proteínas que têm LRR’s e que já tiveram sua estrutura determinada por cristalografia, como por exemplo, proteínas inibidoras de ribonucleases de alguns mamíferos. Estes estudos sugerem que as LRR’s formam uma estrutura denominada “ β -strand- β -turn”, com os resíduos não alifáticos expostos para o meio hidrofílico (NOEL *et al.*, 1999). De acordo com este modelo tais resíduos determinariam a especificidade da interação gene-a-gene (ELLIS *et al.*, 2000b). O fato dos resíduos “x” do consenso serem hipervariáveis reforça essa hipótese (MEYERS *et al.*, 1999).

Funcionalmente, as LRR’s, aparentemente, estão envolvidas na interação proteína-proteína (BENT, 1996). Tem sido sugerido que proteínas

com tais domínios poderiam estar interagindo direta ou indiretamente com o produto do gene de avirulência correspondente e/ou com outras proteínas que integram vias de transdução de sinais que conduzem à ativação da HR e de outras respostas de defesa (BENT, 1996; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997; ELLIS *et al.*, 2000).

Os domínios NBS têm sido relatados em diversas proteínas com atividade de ligação a ATP e GTP, como por exemplo, a subunidade β da enzima ATP sintetase, proteínas ras, adenilato cinases, entre outras (ALBERTS *et al.*, 1994; TRAUT, 1994; ELLIS *et al.*, 2000). A presença do domínio NBS nas proteínas R sugere que a ligação a nucleotídeos trifosfatados seja essencial para a sua atividade (TRAUT, 1994; BENT, 1996). O domínio NBS pode ser subdividido em subdomínios específicos, como as regiões

“P-loop”, “cinase 2A”, cinase “3A” e HD (TRAUT, 1994). Aparentemente, o subdomínio “P-loop”, representado pelo consenso GxxxxGK(T/S), é a região mais conservada do domínio NBS (TRAUT, 1994). Apesar dos avanços relacionados à caracterização estrutural dos domínios NBS, pouco ainda se sabe sobre seu papel na ativação das respostas de defesa contra fitopatógenos (BENT, 1994). Sabe-se, no entanto, que os domínios NBS estão presentes em muitas proteínas envolvidas com o processo de apoptose em mamíferos (TRAUT, 1994).

A classe de genes R que codificam para proteínas com domínios NBS/LRR pode ser dividida em duas subclasses com base em características da extremidade amino da proteína. Em muitos casos verifica-se, nesta região, um domínio que apresenta homologia com receptores de mamíferos (interleucina-1) e de drosófila (Toll), denominado TIR (para Toll, Interleucina 1 e proteína R) (ELLIS *et al.*, 2000a). Tanto Toll quanto IL-1R têm a função de ativar fatores de transcrição. IL-1R, após interação com IL-1, ativa o fator de transcrição NF- κ B. A proteína Toll, participa do controle do desenvolvimento de drosófila, ativando o fator de transcrição Dorsal. É provável que proteínas R com o domínio TIR funcionem de maneira semelhante a Toll e IL-1R (BENT, 1996), ativando vias de transdução de sinais específicas. Em *Arabidopsis*, 75% dos genes que codificam proteínas NBS/LRR {aproximadamente 200 genes (MEYERS *et al.*, 1999)} apresentam um domínio TIR na extremidade amino.

Além das similaridades de sequência, há outros indícios de uma atuação comum para proteínas R com domínios TIR, Toll e IL-1R. Por exemplo, em mamíferos,

a função do fator de transcrição NF- κ B é estimular a produção de espécies ativas de oxigênio, fato que também é observado em plantas, na maioria das interações gene-a-gene incompatíveis. Além disso, a atividade de NF- κ B é influenciada pelo ácido salicílico. Em plantas, este composto pode estimular uma série de respostas de defesa, inclusive aquelas relacionadas com HR (DANGL *et al.*, 1996; BENT, 1996). No caso de Toll, sua atividade é dependente de Pelle, uma proteína cinase do tipo serina/treonina que apresenta alta homologia com a proteína Pto (MORISATO e ANDERSON, 1995).

Proteínas que não apresentam TIR, geralmente apresentam um domínio denominado zíper de leucina (“leucine zipper”, LZ) na extremidade amino. Estruturalmente, os domínios LZ presentes em proteínas R são caracterizados por apresentarem a sequência consenso LxxxYxxL, onde “L” representa o aminoácido leucina, “Y” um aminoácido hidrofóbico e “X” um aminoácido qualquer. Esta sequência repete-se quatro vezes, em tandem. Comparações entre domínios LZ de várias proteínas codificadas por genes de resistência têm demonstrado que, de modo geral, tais domínios apresentam pequena homologia, devido ao fato dos aminoácidos representados por “X” serem altamente variados. Assim como as LRR’s, acredita-se que os domínios LZ favoreçam interações proteína-proteína, devido ao fato de promoverem a formação de estruturas denominadas “coiled-coil” (ALBER, 1992; BENT, 1996). Os LZ’s têm sido relatados em várias proteínas que formam homo ou heterodímeros, principalmente fatores de transcrição de eucariotos (BENT, 1996; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996).

Resultados recentes indicam que as vias de transdução de sinais ativadas após o reconhecimento do patógeno podem ser determinadas pelas características estruturais da extremidade amino da proteína R. Em *Arabidopsis*, por exemplo, as proteínas com domínios LZ/NBS/LRR utilizam uma via dependente do gene *NDRI* (AARTS *et al.*, 1998), distinta da via utilizada por proteínas com domínios TIR-NBS/LRR, que por sua vez é dependente do gene *EDSI* (AARTS *et al.*, 1998; FALK *et al.*, 1999).

O gene *Sw-5* codifica para uma proteína que apresenta domínios LZ/NBS/LRR com alta homologia com a proteína Mi, que confere ao tomateiro resistência a *Meloidogyne* spp. A proteína *Sw-5* é constituída predominantemente por aminoácidos hidrofílicos, o que sugere sua localização citoplasmática (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000). No entanto, há na extremidade amino uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos, que pode

funcionar ancorando a proteína a um sistema de membranas (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000).

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ACESSOS DE *Lycopersicon* spp. A TOSPOVÍRUS

1. INTRODUÇÃO

As viroses causadas por tospovírus estão entre as principais doenças do tomateiro no Brasil, sendo comuns relatos de perdas variando de 30 a 100% da produção (BOITEUX *et al.*, 1993a; POZZER *et al.*, 1996; FAJARDO *et al.*, 1997). As perdas tendem a ser maiores em regiões onde predominam temperaturas elevadas e escassez de chuvas, condições que favorecem a multiplicação e a dispersão dos tripses vetores (BOITEUX *et al.*, 1993b; NAGATA *et al.*, 1995). Outro fator que eleva ainda mais as perdas é o fato de que as principais cultivares de tomate para mesa ou para indústria plantadas no Brasil serem altamente suscetíveis a tospovírus (BOITEUX *et al.*, 1993b; POZZER *et al.*, 1996). Os sintomas mais comumente observados são bronzeamento, necrose nas hastes, pecíolos e folhas, manchas cloróticas em forma de anéis sobre folhas e frutos, necrose apical e morte da planta (GERMAN *et al.*, 1992; POZZER *et al.*, 1996; ROSELLÓ *et al.*, 1996).

Atualmente são reconhecidas ou propostas 13 espécies de tospovírus, sendo que pelo menos quatro (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV, *Groundnut ring spot virus* - GRSV, *Tomato chlorotic spot virus* - TCSV e *Chrysanthemum stem necrosis virus* - CSNV) podem infectar o tomateiro. No Brasil, estas quatro espécies já foram relatadas (NAGATA *et al.*, 1995; POZZER *et al.*, 1999). A importância relativa de cada espécie varia de acordo com a região considerada (NAGATA *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 2000a).

Em levantamentos realizados em 1992-93 (NAGATA *et al.*, 1995) verificaram o predomínio das espécies de TSWV e TCSV no Brasil. Porém, nos últimos cinco anos este cenário vem se alterando. A prevalência das espécies

TSWV e TCSV vem diminuindo (BEZERRA *et al.*, 1999), enquanto a espécie GRSV vem se disseminando em todas as regiões do país (BEZERRA *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2000a).

Vários fatores dificultam o controle das doenças causadas por tospovírus, principalmente a ampla gama de hospedeiros tanto dos vírus quanto dos vetores, a transmissão eficiente e o difícil controle dos vetores, que podem rapidamente tornar-se resistentes aos inseticidas (BOITEUX *et al.*, 1993a; CHO *et al.*, 1996). Dessa maneira, a resistência genética tem sido apontada como a melhor estratégia no manejo das tospoviroses (BOITEUX *et al.*, 1993b; BOITEUX e GIORDANO, 1993; KUMAR e ULLMAN, 1993; STEVENS *et al.*, 1994; ROSELLÓ *et al.*, 1998; ROSELLÓ *et al.*, 1999).

Os primeiros trabalhos em busca de fontes de resistência a tospovírus no germoplasma de *Lycopersicon* foram realizados nas décadas de 1930 e 1940. Tais trabalhos resultaram na identificação de resistência em *L. pimpinellifolium* (SAMUEL *et al.*, 1930) e em *L. esculentum* (HOLMES, 1948). FINLAY (1953) demonstrou que a resistência nessas fontes era condicionada por dois genes dominantes (*Sw-1^a* e *Sw-1^b*) e três recessivos (*sw-2*, *sw-3*, e *sw-4*) e que todos eles proporcionavam resistência do tipo isolado-específica, o que os tornou desinteressantes para uso em programas de melhoramento.

Resistência de amplo espectro contra o TSWV foi identificada em *L. peruvianum* e incorporada em *L. esculentum*, mediante retrocruzamentos, resultando no desenvolvimento da cultivar 'Stevens' (STEVENS *et al.*, 1992). Posteriormente, demonstrou-se que a resistência presente em 'Stevens' é efetiva contra outras espécies de tospovírus que infectam o tomateiro (BOITEUX e GIORDANO, 1993; COLARICCIO *et al.*, 2000), sendo condicionada por um gene dominante, denominado *Sw-5* (STEVENS *et al.*, 1994).

Um novo gene de resistência (*Sw-6*), também originário de *L. peruvianum*, foi recentemente identificado por ROSELLÓ *et al.* (1998). Este gene confere resistência a isolados pertencentes à espécie TSWV e constitui uma alternativa para os programas de melhoramento do tomateiro. Todavia, a eficiência desse gene contra outras espécies de tospovírus restritas à América do Sul (TCSV, GRSV e CSNV) ainda não foi determinada. Além disso, o gene

Sw-6 apresenta como desvantagens os fatos de apresentar dominância incompleta e ter sua eficiência reduzida em inoculações por tripes (ROSELLÓ *et al.*, 1998).

O gene *Sw-5* vem sendo introduzido em vários cultivares brasileiros de tomate industrial ou de mesa (BOITEUX, *et al.*, 1993; ROSELLÓ *et al.*, 1998). Com a expansão da área cultivada com variedades contendo o gene *Sw-5* é possível que sejam selecionadas estirpes capazes de vencer a resistência conferida pelo gene *Sw-5*. Assim, o conhecimento de fontes adicionais de resistência a espécies de tospovírus que ocorrem no Brasil e a incorporação desta resistência em cultivares comerciais é de grande importância para o manejo dessas viroses na cultura do tomateiro.

Desta forma este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de sete acessos da espécie *L. peruvianum*, três de *L. chilense* e dois de *L. hirsutum* a cinco diferentes isolados de tospovírus, bem como determinar a herança da resistência identificada em alguns desses acessos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e ~~manutenção~~manutenção dos isolados virais

Para a avaliação da resistência, as plantas de *Lycopersicon* spp. foram inoculadas com cinco isolados de tospovírus. Os isolados AGR2, TSAL, CVFIT e Cb foram previamente caracterizados biologicamente (gama de hospedeiros), sorologicamente (DAS-ELISA) e molecularmente (clonagem do gene N), visando a determinação das respectivas espécies (Tabela 1). O quinto isolado utilizado (BR01), pertencente à espécie TSWV (Tabela 1), foi cedido pelo Dr. Antônio Carlos de Ávila, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Brasília, Distrito Federal, Brasil. Outro isolado (V1-3), classificado de acordo com os mesmos critérios (Tabela 1), foi empregado numa etapa posterior desse estudo.

Estoques dos isolados virais foram mantidos em ultrafreezer (-80°C), para preservação da integridade do inóculo original. Antes da inoculação, o inóculo original foi multiplicado em *Nicotiana tabacum* cv. Havana 425 ou *Nicotiana benthamiana*.

Tabela 1 - Procedência e identidade dos isolados de tospovírus utilizados neste estudo

Isolado	Procedência	Hospedeiro original	Espécie
AGR2	Mateus Leme – MG	Tomate	TCSV
TSAL	Igarapé – MG	Alface	TCSV
CVFIT	Viçosa – MG	Tomate	CSNV
BR01	Brasília – DF	Tomate	TSWV
Cb	Campos dos Goytacazes – RJ	Cubiu	GRSV
V1-3	Viçosa – MG	Tomate	TCSV

2.2. Avaliação da resistência de acessos de *Lycopersicon chilense* e *L. peruvianum*

Plantas de sete acessos de *L. peruvianum* (PI 212407, PI 126928, LA 126444, LA 126944, LA 444/1, LA 371 e LA 385), três acessos de *L. chilense* (LA 2753, LA 1969 e LA 130) e dois acessos de *L. hirsutum* (PI 134417 e PI 126449) foram avaliadas quanto à resistência a tospovírus. Plantas de *L. esculentum* cvs. Santa Clara e Piedmont foram utilizadas como controles suscetíveis e plantas da linhagem SW99-1, que contém o gene Sw-5, como controle resistente. Os acessos PI e LA foram fornecidos, respectivamente pelo USDA Germplasm Repository, Geneva, NY, EUA e Tomato Genetics Stock Center, Universidade da Califórnia, Davis, EUA.

Visando obter germinação e crescimento uniforme das plantas as sementes foram mantidas em placas de Petri revestidas com papel de filtro umedecido com água esterilizada, até a germinação. Em seguida, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 1,5 L, contendo mistura de solo + esterco, previamente esterilizada, os quais foram mantidos em casa de vegetação. Cerca de 30 dias após o plantio, as plantas foram propagadas vegetativamente, mediante o processo de estaquia, de maneira a se obter quatro clones de cada planta, os quais foram independentemente

inoculados com os isolados AGR2, TSAL, CVFIT e BR01. Cada estaca se constituiu numa seção de haste com aproximadamente 4 cm (2 a 3 gemas). As estacas foram plantadas em tubetes contendo vermiculita. Os tubetes foram apoiados sobre um suporte de isopor mantido numa bandeja com água suficiente para cobrir a base do tubete, até o enraizamento. Após o desenvolvimento do sistema radicular, os clones foram transferidos para vasos plásticos com capacidade para 1,5 L contendo solo estéril e mantidos em casa de vegetação. O procedimento de clonagem foi facilitado pela abundante emissão de brotações laterais e pela grande capacidade de enraizamento das espécies avaliadas e possibilitou a determinação da reação de uma mesma planta a isolados distintos de tospovírus.

As plantas foram submetidas a duas inoculações via extrato foliar, realizadas com intervalo de sete dias. A segunda inoculação visou evitar a ocorrência de escapes. Folhas de *Nicotiana tabacum* cv. Havana 425 ou *N. benthamiana* sistemicamente infectadas consistiram na fonte de inóculo. As folhas foram maceradas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 contendo 0,2 % de sulfito de sódio e 0,01 % de carborundum (600 mesh). A reação das plantas foi avaliada diariamente. Decorridos 30 dias após a segunda inoculação, as plantas que não desenvolveram sintomas foram submetidas a DAS-ELISA para comprovar a ausência do vírus. Para isso foi utilizado um antissoro policlonal (Agdia Inc., Mishawaka, Indiana, EUA) capaz de reconhecer a proteína do nucleocapsídeo de todos os isolados empregados no estudo. O procedimento de DAS-ELISA foi executado de acordo com as recomendações do fabricante.

Algumas plantas que se comportaram como resistentes aos isolados AGR2, TSAL, CVFIT e BR01, foram propagadas vegetativamente e inoculadas com o isolado Cb, pertencente à espécie GRSV (Tabela 1). As plantas inoculadas foram: 126444-3, 444/1-19, 126928-2, 126928-4, 371-11, 371-20, 126944-6, 126944-12 e 126944-17 de *L. Peruvianum* e 2753-11, 130-1, 130-5 de *L. chilense*. Plantas das cultivares Piedmont e Santa Clara constituíram os controles de suscetibilidade e plantas da linhagem SW99-1 nos controles de resistência. As inoculações, avaliações e DAS-ELISA foram efetuados conforme descrito no parágrafo anterior.

2.3. Determinação da herança da resistência de *Lycopersicon peruvianum* PI 126928 e LA 444/1-19

Para avaliar a herança da resistência observada nos acessos PI 126928 e LA 444/1-19, realizaram-se cruzamentos entre plantas resistentes e suscetíveis, identificadas na etapa anterior. No caso de PI 126928 foram cruzadas as plantas 126928-9 (susceptível) e 126928-16 (resistente). Da progênie F1 resultante, foram inoculadas 32 plantas com o isolado TSAL. Algumas plantas resistentes desta geração foram cruzadas entre si, bem como retrocruzadas com o parental suscetível, para obtenção de populações segregantes. Também foram cruzadas as plantas 212407-17 (susceptível) e 444/1-19 (resistente). Da progênie F1 resultante 26 plantas foram inoculadas com o isolado TSAL. Algumas plantas resistentes desta geração foram cruzadas entre si e também retrocruzadas com o parental suscetível, para obtenção de populações segregantes.

2.4. Avaliação da resistência de acessos de *Lycopersicon hirsutum*

Sementes de *L. hirsutum* PI 134417 e PI 126449 foram semeadas em vasos plásticos contendo solo esterilizado, os quais foram mantidos em casa de vegetação. Quando as plantas apresentaram o primeiro par de folhas expandidas foram transferidas para vasos com capacidade para 1,5 L, contendo solo estéril. Inicialmente as plantas foram inoculadas com um único isolado (AGR2). As plantas consideradas como resistentes ao primeiro isolado foram propagadas vegetativamente e os clones obtidos foram inoculados com os isolados TSAL, CVFIT e BR01. Posteriormente, as plantas 134417-4 4 134417-10 foram propagadas vegetativamente e inoculadas com o isolado Cb para verificar se a resistência observada também era eficiente para a espécie GRSV. As inoculações, avaliações e DAS-ELISA foram efetuados conforme descrito no item 2.2.

2.5. Determinação da herança da resistência de *Lycopersicon hirsutum* PI 134417

As plantas consideradas resistentes foram empregadas como progenitores masculinos em cruzamentos com *L. esculentum* (cvs. Santa Clara, Sw-99-1 e Miller). As plantas híbridas foram retrocruzadas com seus progenitores femininos ou autofecundadas gerando as populações RC1 e F2, respectivamente, as quais também foram inoculadas. A análise da segregação da resistência ou suscetibilidade na população F2 do cruzamento entre SW99-1 e PI 134417-10 permitiu inferir se a resistência identificada nesse material era condicionada por um alelo do loco *Sw-5* ou por um outro gene.

Plantas homo e heterozigóticas para o gene de resistência de PI 134417-10-10 foram utilizadas para verificar se este gene era efetivo na condição heterozigótica. Vinte e quatro plantas híbridas (Santa Clara x PI 134417-10-10) e 40 plantas homozigóticas (geradas pela autofecundação da planta PI 134417-10-10) foram inoculadas com os isolados AGR2 e V1-3. Plantas homozigóticas (SW99-1) e heterozigóticas (Santa Clara x SW99-1) para o gene *Sw-5* também foram inoculadas para comparar a resistência presente em 134417-10-10 com a resistência conferida pelo gene *Sw-5*. O isolado V1-3, pertencente à espécie TCSV (Tabela 1), apresenta a capacidade de infectar, com frequência de aproximadamente 100%, plantas de *L. esculentum* heterozigóticas para o gene *Sw-5*, bem como algumas plantas homozigóticas (frequência entre 20-30%) (LAU, 2000).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da resistência de acessos de *Lycopersicon chilense* e *L. peruvianum*

A maioria dos genótipos inoculados apresentou um baixo percentual de plantas infectadas, destacando-se os acessos LA 371, LA 444/1, PI 126944 e PI 126928, de *L. peruvianum* e LA 2753 e LA 130 de *L. chilense* (Tabela 2). A quase totalidade das plantas inoculadas apresentou resistência de amplo espectro (efetiva contra os quatro isolados) (Tabela 2). No entanto, resistência do tipo espécie-específica ou do tipo isolado-específica foi em alguns casos observada. Por exemplo, todas as plantas do acesso LA 385 de *L. peruvianum* foram resistentes aos isolados CVFIT (CSNV) e BR01 (TSWV), mas suscetíveis ao isolado TSAL (TCSV). No caso do acesso LA 1969 de *L. chilense*, as seis plantas inoculadas foram resistentes ao isolado AGR2 (TCSV), enquanto três dessas plantas foram suscetíveis a outro isolado da mesma espécie (TSAL) (Tabela 2). Um outro exemplo de resistência isolado-específica pode ser observado na Tabela 3. Todas as plantas do acesso PI 126928 comportaram-se como resistentes aos isolados CVFIT e BR01, mas apresentaram comportamentos distintos para os isolados AGR2 e TSALF. A planta 5 foi resistente ao TSAL e suscetível ao AGR2. Comportamento inverso se verificou para as plantas 14 e 16, que foram suscetíveis ao isolado TSALF e resistentes ao isolado AGR2.

Tabela 2 - Resistência de acessos de *Lycopersicon peruvianum* e *L. Chilense* a diferentes isolados de tospovírus

Genótipo	Isolado			
	AGR2 (TCSV)	TSAL (TCSV)	CVFIT (CSNV)	BR01 (TSWV)
<i>L. peruvianum</i>				
PI 212407	15/15*	11/17	18/19	15/15
PI 126928	16/17	13/15	17/17	17/17
LA 126444	10/13	09/13	13/13	10/13
LA 126944	08/08	12/16	20/20	
LA 444/1	15/16	20/20	22/22	15/16
LA 371	17/17	-	19/19	17/17
LA 385	-	00/05	05/05	05/05
<i>L. chilense</i>				
LA 2753	10/10	-	12/12	10/10
LA 1969	06/06	03/06	06/06	06/06
LA 130	05/05	05/05	04/05	-
Santa Clara	00/04	05/05	00/05	00/04
Piedmont	00/04	00/05	00/05	00/04
SW-99	04/04	05/05	05/05	04/04

* N^o de plantas resistentes/N^o de plantas inoculadas.

- Não-avaliado.

Tabela 3 - Comportamento de plantas do acesso PI 126928 a diferentes isolados de tospovírus

Isolado	Número de referência da planta inoculada																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	15	17
AGR2	R ¹	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TSAL	-	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
CVFIT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BR01	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

¹R = Resistente; S = suscetível; - = Não-avaliado.

Todas as plantas inoculadas com o isolado Cb (GRSV) comportaram-se como resistentes, enquanto que os controles suscetíveis desenvolveram sintomas sistêmicos em cinco a sete dias após a inoculação.

Devido ao baixo percentual de germinação e à pequena capacidade de adaptação de alguns acessos, principalmente no caso de *L. chilense*, o número de plantas avaliadas foi pequeno, porém na maioria das vezes suficiente para se identificar resistência de amplo espectro. Não foi possível avaliar a resistência de alguns acessos a determinados isolados, pois nesses casos uma aplicação de inseticidas provocou fitotoxidez e morte de plantas.

Os isolados empregados nesse estudo apresentaram grande variação com relação à capacidade de infecção. De um modo geral, o isolado TSAL mostrou-se mais agressivo que os demais (Tabela 2). Esses dados reforçam a importância da utilização de mais de um isolado na avaliação para a resistência.

A resistência observada na maioria dos acessos de *L. peruvianum* foi aparentemente baseada na reação de hipersensibilidade, pois inúmeras lesões necróticas foram observadas nas folhas inoculadas, 3 a 4 dias após a inoculação (Figura 1A). Nas plantas suscetíveis tais lesões não se



Figura 1 - Sintomas apresentados pelas plantas de *Lycopersicon peruvianum* LA 444/1-19 inoculadas com *Tomato chlorotic spot virus* (TCSS), isolado TSAL. A - Lesões necróticas que se desenvolveram nas folhas inoculadas de plantas resistentes, 4 a 5 dias após a inoculação. B - Sintomas sistêmicos observados em plantas suscetíveis.

desenvolveram e os sintomas da doença começaram a ser observados entre sete e dez dias após a inoculação. Os sintomas consistiram de lesões cloróticas circulares nas folhas inoculadas e necrose da haste, pecíolos e região apical, que freqüentemente culminaram com a morte da planta (Figura 1B). Por outro lado, plantas resistentes de *L. chilense* não apresentaram nenhuma alteração fenotípica após a inoculação. Aproximadamente 5 % das plantas assintomáticas ou apresentando HR de *L. peruvianum* ou de *L. chilense* foram ELISA-positivas.

3.2. Herança da resistência em *Lycopersicon peruvianum*

A segregação da resistência na geração F1 do cruzamento PI 126928-9(S) e PI 126928-6(R) ajustou-se a uma proporção de 15 plantas resistentes:1 planta suscetível ($p=0,97$), corroborando a hipótese da resistência de PI 126928-6(R) ser conferida por dois genes dominantes independentes (Tabela 4). Todavia, não se observou segregação para resistência quando 70 plantas derivadas do cruzamento de duas plantas resistentes dessa progênie foram inoculadas. Caso a hipótese inicial fosse verdadeira, também se esperava nessa população uma segregação que se ajustasse à proporção de 15:1 (R:S), mas os valores observados foram muito diferentes do esperado ($p=0,031$). Na progênie RC1 (cruzamento entre PI 126928-9(S) e uma planta F1 resistente), apenas uma planta suscetível foi observada dentre as 86 inoculadas. Esses dados sugerem que mais de dois genes independentes determinam a resistência do acesso PI 126928 ao isolado TSAL de TCSV.

No caso da planta 444/1-19, a hipótese de pelo menos dois genes dominantes independentes controlando a resistência ao mesmo isolado também pode ser inferida (Tabela 4). Quando a progênie originada do cruzamento dessa planta com a planta 212407-17 (suscetível) foi inoculada, apenas uma planta suscetível foi observada entre as 24 inoculadas. Na progênie RC1 (cruzamento entre o parental suscetível e uma planta F1 resistente), observou-se uma planta suscetível entre as 34 inoculadas. Os dados obtidos ajustam-se a um modelo de dois genes dominantes

Tabela 4 - Análise de segregação da resistência ao isolado TSAL de TCSV (*Tomato chlorotic spot tospovirus*) nos acessos PI 126928 e LA 444/1 de *Lycopersicon peruvianum*

Genótipo	Segregação ¹ (R:S)	Razão (R:S)	χ^2	Probabilidade
126928-9 (S) x 126928-16 (R)	31:2	15:1	0,01	0,96
F1 (R) x F1 (R)	70:0	15:1	4,6	0,03
126928-9 x F1 (R) (RC1)	85:1	15:1	3,8	0,05
212407-17 (S) x 444/1-19 (R) (F1)	23:1	15:1	0,5	0,57
212407-17 (S) x F1 (R) (RC1)	33:1	15:1	0,6	0,52
SW99-1	16:0			
Santa Clara	0:16			
Piedmont	0:16			

¹Número de plantas resistentes:número de plantas suscetíveis.

independentes ($p=0,52$) (Tabela 4). Contudo, esses resultados deverão ser confirmados inoculando-se um número maior de plantas pois, para uma progênie RC1, no mínimo 47 plantas são necessárias para se validar a hipótese de segregação de dois genes dominantes independentes (HANSON, 1959)

3.3. Avaliação da resistência de acessos de *L. hirsutum*

Nos dois acessos de *L. hirsutum* (PI 134417 e PI 126449) avaliados, verificou-se, respectivamente, que 11,1 e 42, 8 % das plantas comportaram-se como resistentes ao isolado TSAL (Tabela 5). As plantas resistentes foram propagadas vegetativamente, e os clones obtidos também apresentaram

Tabela 5 - Incidência do *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), isolado TSAL em acessos de *Lycopersicon hirsutum*

Acesso	Número de plantas inoculadas	Incidência
PI 134417	40	36/40
PI 126449	50	35/50
Santa Clara	35	0/35
Piedmont	35	0/35
SW99-1	40	40/40

resistência aos isolados AGR2, CVFIT e BR01. As plantas 134417-4 e 134417-10 também se comportaram como resistentes ao isolado Cb, demonstrando assim, que a resistência observada é de amplo espectro. A reação das outras plantas de *L. hirsutum* a este isolado não foi avaliada.

Todas as plantas resistentes dos acessos PI 134417 e PI 126449 apresentaram inúmeras lesões necróticas locais, típicas da reação de hipersensibilidade, três a quatro dias após a inoculação (Figura 2A). Nesses casos as lesões não se expandiram e nenhum sintoma sistêmico foi observado. Entre as plantas classificadas como suscetíveis foram verificados dois tipos de sintomas. Na maioria das vezes, as plantas apresentaram lesões locais com aspecto muito semelhante àsquelas observadas nas plantas resistentes. No entanto, estas lesões expandiram e freqüentemente atingiram as nervuras e os pecíolos. Nessas plantas também se observou necrose das hastes, ápice e brotações laterais (Figura 2B). Em tais circunstâncias, o tecido vegetal apresentava um aspecto dessecado e quebradiço. Em algumas plantas suscetíveis foram observadas, nas folhas inoculadas, lesões cloróticas e não-necróticas. Tais lesões surgiram cinco a sete dias após a inoculação. Depois desse período, sintomas sistêmicos foram comumente observados. Esses sintomas consistiram de lesões cloróticas, bronzeamento e mosaico nas folhas não-inoculadas.

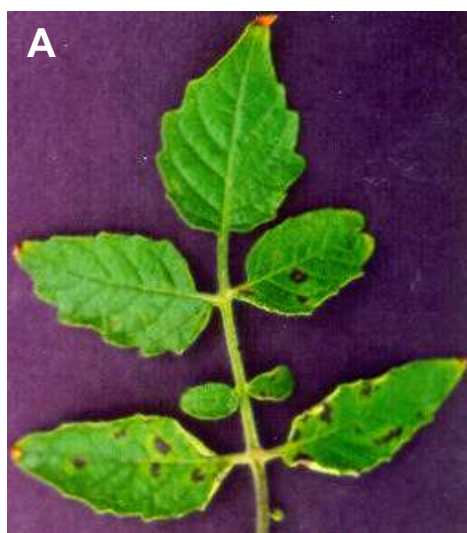


Figura 2 - Sintomas apresentados pelas plantas de *Lycopersicon hirsutum* PI 134417 inoculadas com *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), isolado TSAL. A - Lesões necróticas que se desenvolveram nas folhas inoculadas de plantas resistentes, 3 a 4 dias após a inoculação. B - Sintomas sistêmicos observados em plantas suscetíveis, 7 dias após a inoculação.

3.4. Herança da resistência de *Lycopersicon hirsutum* PI 134417 ao isolado TSAL de *Tomato chlorotic spotted virus*

Observou-se segregação para resistência na geração F1 derivada do cruzamento das plantas resistentes de *L. hirsutum* com *L. esculentum* (Tabela 6), indicando a existência de heterozigose no material resistente selecionado e/ou possível controle poligênico da resistência. As proporções de segregação obtidas para os cruzamentos Miller x 134417-4 e Miller x 134417-10 favorecem a hipótese de um gene dominante em heterozigose em PI 134417-4 ($p=0,34$) e PI134417-10 ($p=0,75$). Verificou-se ainda que há uma alta probabilidade de que a resistência presente na planta 134417-21 seja condicionada por um único gene recessivo ($p=0,85$). A segregação observada na progênie do cruzamento Miller x 134417-2 não se ajustou a qualquer modelo simples de herança (Tabela 6).

Algumas plantas resistentes do cruzamento Miller x 134417-10, foram autofecundadas, originando populações F2. Duas dessas populações (Miller x 134417-10-10 e Miller x 134417-10-7) foram avaliadas quanto à resistência ao isolado TSAL. Os dados de segregação ajustaram-se a proporções inversa, ou seja, 3:1 (R:S) e 1:3 (R:S). Esses dados sugerem que a planta resistente inicialmente selecionada (PI134417-10) apresenta dois genes para resistência a tospovírus, um dominante e um recessivo, ambos em heterozigose. Esses genes segregaram independentemente durante a meiose, sendo que a planta 134417-10-10 recebeu o gene de resistência dominante e a planta 134417-10-7 o gene de resistência recessivo (Tabela 6).

Para verificar se o gene dominante presente em PI 134417-10-10 é um alelo do loco *Sw-5*, o híbrido 134417-10-10 x Miller foi cruzado com plantas da linhagem SW99-1, que contém o gene *Sw-5*. Como esperado, todas as plantas dessa progênie comportaram-se como resistentes (Tabela 6). Algumas plantas dessa progênie foram autofecundadas e a segregação para a resistência na progênie, avaliada. Das 92 plantas inoculadas, apenas oito comportaram-se como suscetíveis, indicando que o gene dominante presente em PI 134417-10-10 não é uma forma alélica do gene *Sw-5* (Tabela 6).

Tabela 6 - Segregação para resistência ao *Tomato chlorotic spot virus*, isolado TSAL, nas progênies resultantes de cruzamentos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. hirsutum* PI 134417

Genótipo	Segregação ¹ (R:S)	Razão (R:S)	χ^2	Prob.
Miller (S)x 134417-4 (R)	23:17	1:1	0,9	0,34
Miller (S)x 134417-10 (R)	21:19	1:1	0,1	0,75
Miller (S) x 134417-2 (R)	41:6	15:1	3,4	6,5
Miller (S) x 134417-21 (R)	10:28	1:3	0,04	0,85
134417-10 ⊗	37:10	13:3	0,2	0,66
Miller x 134417-10-10 (R) ⊗	42:18	3:1	0,8	0,37
Miller x 134417-10-7 (R) ⊗	6:15	1:3	0,1	0,71
SW99-1 x (Miller x 134417-10-10)	24:0			
SW99-1 x (Miller x 134417-10-10) ⊗	84:8	15:1	0,9	0,33
SW-99-1 x Miller	24:0			
SW-99-1 x Miller ⊗	45:10	3:1	1,4	0,24
Miller	0:24			
SW99-1	24:0			

¹R = resistente, S = suscetível;

Os dados referentes à segregação da progênie F2 do cruzamento entre Sw99-1 e Miller também sugerem que a resistência é realmente originária de *L. hirsutum* e não devido a uma possível interação entre genes menores de Miller e SW99-1. Como esperado, a segregação observada nessa população se ajustou a um modelo 3:1 ($p=0,24$) (Tabela 6). Ou seja, nessa progênie apenas um gene dominante está conferindo resistência – o gene Sw-5, derivado de SW99-1.

Apesar de não ser um alelo do loco *Sw-5*, o gene dominante presente em PI 134417-10-10 apresentou comportamento similar a *Sw-5* quando em heterozigose. Nesta condição, este gene não é capaz de restringir o isolado V1-3 às folhas inoculadas (Tabela 7). Porém, nesta mesma condição e de forma similar a *Sw-5*, este gene é capaz de conferir resistência a outro isolado de TCSV (TSAL) (Tabela 7). Com relação ao gene recessivo presente em PI 134417-10-7 evidenciou-se sua efetividade também contra o isolado V1-3 (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito da heterozigose na resistência de PI 134417-10-10 e SW99-1 a dois isolados de *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV)

Genótipo	Incidência*	
	V1-3	TSAL
134417-10-10	38:2	40:0
SW99-1	23:1	24:0
Santa Clara	0:24	0:24
SW99-1 x 134417-10-10	2:22	24:0
Santa Clara x 134417-10-10	0:24	23:1
Santa Clara x SW99-1	0:24	24:0
134417-10-7	34:2	32:4
SW99-1 x 134417-10-7	30:6	36:0
Santa Clara x 134417-10-7	0:24	0:24

* N^o de plantas resistentes: N^o de plantas com sintomas sistêmicos.

4. DISCUSSÃO

Confirmou-se neste trabalho a resistência de vários acessos de *Lycopersicon peruvianum*, *L. chilense* e *L. hirsutum* ao TSWV, já evidenciada por outros pesquisadores (PATERSON *et al.*, 1989; STEVENS *et al.*, 1992; IIZUKA *et al.*, 1993; KUMAR e ULLMAN, 1993; CHO *et al.*, 1996; ROSELLÓ *et al.*, 1999). Plantas desses acessos também foram resistentes a isolados das espécies TCSV, CSNV e GRSV, indicando a existência nestes materiais de genes que podem ser utilizados em programas de melhoramento visando resistência às espécies de tospovírus que ocorrem em tomateiro no Brasil.

Destacaram-se, pelo baixo percentual de plantas suscetíveis, os acessos PI 126944, LA 126928, LA 444/1-19 e LA 371 de *L. peruvianum* e LA 130 e LA 2753 de *L. chilense*. Os acessos PI 126944, LA 130 e LA 2753 são particularmente interessantes para esta finalidade, pois são relatados como resistentes a diferentes isolados de TSWV dos Estados Unidos (PATERSON 1989; STEVENS *et al.* 1994). PI 126944 também apresentou imunidade a dois isolados espanhóis de TSWV (ROSELLÓ *et al.*, 1999).

Compatível com o sistema de reprodução das espécies avaliadas, ou seja, fecundação cruzada, constatou-se, à exceção de LA 371 e LA 2753, heterogeneidade na resposta de resistência entre plantas de um mesmo acesso. Em função do método de avaliação de resistência empregado, esta heterogeneidade permitiu inferir a existência de genes com diferentes espectros de resistência no restrito número de acessos avaliados. Por

exemplo, determinadas plantas do acesso LA 1969 mostraram reações contrastantes aos isolados AGR2 e TSAL de TCSV e todas as plantas do acesso LA 385 de *L. peruvianum* foram resistentes aos isolados CVFIT (CSNV) e BR01 (TSWV) e suscetíveis ao isolado TSAL (TCSV). Entretanto, na maioria das plantas a resistência foi efetiva contra todos os isolados inoculados.

Variabilidade na resposta de cultivares de *L. esculentum* e dentro de acessos de *Lycopersicon* spp. a diferentes isolados de TSWV já foi demonstrada por diferentes pesquisadores (PATERSON *et al.*, 1989; STEVENS *et al.*, 1992; IIZUKA *et al.*, 1993; KUMAR e ULLMAN, 1993; ROSELLÓ *et al.*, 1999). Como base nestes resultados e naqueles obtidos neste estudo é possível concluir que seja comum em *Lycopersicon* spp. variabilidade para resistência às várias espécies de tospovírus

Resistência espécie-específica a tospovírus tem sido descrita em *Capsicum chinense* (BOITEUX, 1995). O gene *Tsw* confere resistência a diferentes isolados de TSWV, mas não confere resistência a isolados de TCSV e GRSV. O fato de LA 385 somente apresentar resistência a TCSV e CSNV indica que também é possível identificar no germoplasma de tomateiro genes com espectro de atuação restrito a uma ou mais espécies de tospovírus. Este tipo de resistência espécie-específico não foi descrito em *Lycopersicon* spp.

É possível que o amplo espectro de resistência em alguns acessos avaliados seja devido à presença em um mesmo acesso de diferentes genes conferindo resistência isolado-específica, espécie-específica e de amplo-espectro. Esta possibilidade é sugerida pela variabilidade do espectro de resistência observada entre plantas de um mesmo acesso, e a complexidade do controle genético da resistência evidenciada para as plantas PI 126928-16 e LA 444/1-19 de *L. peruvianum*. Desta forma, é essencial que as populações segregantes sejam avaliadas com um espectro adequado de isolados do patógeno, pelo menos nas etapas iniciais do processo de incorporação da resistência em cultivares comerciais. Evitar-se-ia, desta forma, a possibilidade do desenvolvimento de linhagens com espectro de resistência inferior ao da fonte doadora e a perda de genes que conferem resistência de amplo espectro durante o processo de melhoramento.

Devido aos problemas de incongruidade e de incompatibilidade sexual de *L. peruvianum* com o tomateiro cultivado, a herança da resistência de

alguns acessos desta espécie foi efetuada intercruzando-se plantas resistentes e suscetíveis de um mesmo acesso ou de acessos diferentes. As segregações obtidas indicaram a presença de pelo menos dois genes dominantes independentes em LA 444/1-19 e mais de dois genes independentes em PI 126929-16. KUMAR e IRULAPPAN (1992) verificaram que a resistência de *L. peruvianum* LA 385 é governada por três ou mais genes recessivos. WATTERSON *et al.* (1989) relataram que a resistência num acesso de *L. peruvianum* seria controlada por um gene dominante com um ou mais genes modificadores. No material resistente avaliado por STEVENS *et al.* (1992) e ROSELLÓ *et al.* (1998), derivado de *L. peruvianum*, a resistência segregou como uma característica controlada por um único gene dominante. Esta variabilidade no controle genético da resistência relatado por diferentes autores pode ser explicada pelas diferenças nos acessos analisados, isolados e métodos de inoculação empregados na avaliação da resistência (extrato foliar infectado ou tripes). Estudos adicionais são necessários para determinar se alguns dos genes identificados em LA 441/1 e PI 126929 são idênticos ou alélicos aos genes descritos por FINLAY (1953), STEVENS *et al.* (1992) e ROSSELÓ *et al.* (1998).

A eliciação de resposta de hipersensibilidade parece ser o mecanismo envolvido na resistência dos acessos de *L. peruvianum* avaliados. Cerca de três a quatro dias após a inoculação, são observadas inúmeras lesões necróticas nas folhas inoculadas. Tais lesões foram muito semelhantes às observadas em plantas da linhagem SW99-1 e não se desenvolveram nas plantas suscetíveis. No caso de *L. chilense*, as plantas resistentes não apresentaram lesões necróticas, contudo a HR não pode ser descartada uma vez que pode ter ocorrido em nível microscópico. Tal fato tem sido observado em algumas interações (KAMOUN *et al.*, 1998).

Devido às barreiras de incompatibilidade com o tomateiro cultivado, *L. peruvianum* e *L. chilense* são espécies difíceis de serem usadas em programas de melhoramento. Os resultados obtidos indicam que os acessos PI134417 e 126449 de *L. hirsutum* também podem representar alternativas para o desenvolvimento de cultivares de tomateiro com resistência de amplo espectro contra tospovírus. As sementes F1 são viáveis, não requerendo o cultivo de sementes imaturas ou resgate de embriões para a introgressão da

resistência. Considerando os dois acessos avaliados, PI 126449 apresentou o maior percentual de plantas resistentes. As plantas de *L. hirsutum* classificadas como resistentes em ambos os acessos avaliados apresentaram resistência efetiva contra todos os isolados de tospovírus inoculados. A análise da herança da resistência indicou que a resistência de PI 134417-10 é determinada por dois genes independentes, um recessivo e outro dominante. O gene dominante segregou de maneira independente do gene *Sw-5*, indicando que se localizam em locos distintos. Porém, este gene e *Sw-5* apresentam em comum a característica de não conferir resistência ao isolado V1-3 no estado heterozigótico.

O fato de plantas resistentes e suscetíveis de *L. hirsutum* responderem com lesões necróticas locais, três a quatro dias após a inoculação, sugere que outros mecanismos estejam envolvidos na resistência desta espécie a tospovírus. As lesões necróticas, que podem ser consequência do reconhecimento de algum componente viral, não são suficientes para confinar o vírus às folhas inoculadas como no caso de *L. peruvianum*. Outros requisitos pós-reconhecimento parecem ser necessários para a contenção do patógeno ao sítio de infecção.

Uma observação que corrobora a ocorrência de um evento de reconhecimento mesmo nas plantas suscetíveis de *L. hirsutum* é a necrose sistêmica observada. Essa é uma característica peculiar desse material e não foi observada nas demais espécies avaliadas. IIZUKA *et al.* (1993) também relataram que plantas de *L. hirsutum* PI 134417 apresentam uma necrose sistêmica quando inoculadas com isolados de tospovírus. O fenômeno de necrose sistêmica foi observado por LAU (2000) em plantas de *L. esculentum* expressando o gene *Sw-5*, inoculadas com tospovírus. O autor concluiu que o isolado, a temperatura e a condição de heterozigose do gene de resistência são fatores que determinam a frequência da necrose sistêmica.

Embora a resistência genética represente a opção mais viável de controle de tospovírus na cultura do tomateiro (STEVENS *et al.*, 1994; CHO *et al.*, 1996; ROSELLÓ *et al.*, 1997; ARAMBURU e RODRIGUEZ, 1999; ROSELLÓ *et al.*, 1999) existem poucos cultivares comerciais resistentes a tospovírus. Um dos fatores que contribuem para este cenário é a dificuldade de incorporar a resistência em variedades comerciais. Devido ao espectro de

resistência proporcionado e pelo fato de já está incorporado em *L. esculentum*, Sw-5 é o principal gene de resistência a tospovírus utilizado em programas de melhoramento (ROSELLÓ *et al.*, 1998; ROSELLÓ *et al.*, 1999). Esse fato é preocupante, pois o aumento da área cultivada com variedades com Sw-5 poderá resultar na seleção de estirpes contra as quais a resistência seja ineficiente. Isolados com essa característica já foram relatados por LATHAM e JONES (1998), COLARICCIO *et al.* (2000); LAU (2000) e HOFFMANN *et al.* (2001). No presente trabalho foram identificados genótipos de tomateiro com alto nível de resistência a tospovírus. Na maioria dos casos, a resistência observada foi de amplo espectro, indicando que essas fontes podem ser aproveitadas em programas de melhoramento de tomateiro visando resistência a tospovírus. Em curto prazo, a resistência identificada em *L. hirsutum* 134417 pode representar uma melhor opção para o desenvolvimento de cultivares resistentes, uma vez que esta espécie apresenta maior facilidade de cruzamento com o tomateiro cultivado. O fato do gene dominante identificado em *L. hirsutum* não ser uma forma alélica do gene Sw-5 constitui uma outra vantagem, pois esses dois genes podem ser combinados numa mesma cultivar. Para essa cultivar hipotética, a probabilidade de ser selecionada uma estirpe capaz de superar a resistência condicionada por dois genes independentes seria bem menor do que se for considerada a resistência proporcionada por um único gene. Para facilitar essa estratégia, marcadores para os genes de resistência de *L. hirsutum* devem ser identificados.

Outros importantes requisitos para o emprego desses genes em programas de melhoramento do tomateiro seriam a determinação do efeito da temperatura e da inoculação por tripes na expressão da resistência. Tais fatores podem influenciar o nível de resistência conferida pelos genes identificados, a exemplo do que ocorre com os genes Sw-5 e Sw-6 (ROSELLÓ *et al.*, 1997; ROSELLÓ *et al.*, 1999; ARAMBURU e RODRIGUEZ, 1999; LAU, 2000).

Capítulo 2

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE ALELOS DO LOCO *Sw-5* PROVENIENTES DE *Lycopersicon* spp.

1. INTRODUÇÃO

Em várias interações hospedeiro-patógeno, o reconhecimento pela planta, de moléculas produzidas por patógenos avirulentos (elicitores), resulta na indução de um conjunto de respostas de defesa, incluindo a reação de hipersensibilidade, HR (GABRIEL e ROLF, 1990; BENT, 1996; JONES e DANGL, 1996). Fenotipicamente, a HR é expressa como a morte rápida das células em torno do sítio primário de infecção, culminando com a retenção do patógeno neste local (JONES e DANGL, 1996; PONTIER *et al.*, 1998; HUTCHESON, 1999; KAMOUN *et al.*, 1999). A base genética dessas interações é descrita pela teoria gene-a-gene estabelecida por FLOR (1971). De acordo com essa teoria a resistência só ocorre quando há a expressão simultânea de um gene de avirulência (*Avr*) no patógeno e de um gene de

resistência (*R*) correspondente no hospedeiro (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997).

Nos últimos anos, a teoria gene-a-gene tem recebido um vasto suporte experimental, principalmente devido à identificação e à caracterização funcional de genes *R* e *Avr*. Vários genes *Avr* codificam elicitores que, quando infiltrados ou expressos no interior de uma célula que apresenta o gene *R* correspondente, ativam uma série de reações de defesa, inclusive HR, de maneira semelhante ao observado quando patógenos avirulentos são inoculados (GOPALAN *et al.*, 1996; ELLIS *et al.*, 2000a; STHAL e BISHOP, 1998). Os genes *R*, por sua vez, aparentemente codificam para receptores específicos que interagem direta ou indiretamente com os elicitores, iniciando uma via de transdução de sinais que conduz à HR e à expressão de outras respostas de defesa (JONES e DANGL, 1996; PONTIER *et al.*, 1998; HUTCHESON, 1999; ELLIS *et al.*, 2000a).

A comparação entre genes *R* de diferentes espécies vegetais revelou que, independente do patógeno considerado, as proteínas correspondentes apresentam domínios estruturais conservados, sugerindo a utilização de mecanismos conservados de reconhecimento de patógenos e sinalização de respostas de defesa, entre as plantas (BENT, 1996; HAMOND-KOSACK e JONES, 1997; WARREN *et al.*, 1998). Alguns desses mecanismos também apresentam analogias com a resposta imune de vertebrados e invertebrados (ALFANO e COLLMER, 1996; BENT, 1996; YU *et al.*, 1998).

Os principais domínios evidentes nas seqüências aminoácidos deduzidas dos genes de resistência caracterizados até o momento são: repetições ricas em leucina (LRR's – “Leucine Rich Repeats”), sítios para ligação a nucleotídeos (NBS – “Nucleotide Binding Site”), feixes de leucina (LZ – “Leucine Zipper”) e domínios característicos de proteínas transmembranas que desempenham função de sinalizadores celulares, como a proteína Toll de *Drosophilla* e o receptor Interleucina-1 de mamíferos (TIR, para Toll, receptor Interleucina-1 e proteína R, PARKER *et al.*, 1997).

Repetições ricas em leucina foram observadas em todos os genes de resistência que seguem uma relação gene-a-gene clonados, com exceção de *Pto*. No entanto, a resistência conferida por *Pto* só é expressa na presença de um outro gene – *Prf* – que apresenta LRR (MARTIN *et al.*, 1994). A seqüência

de consenso de cada unidade das LRR's é LxxLxLxx, onde o "x" significa qualquer aminoácido e o "L", leucina ou outro aminoácido alifático. Em geral, cada LRR é constituída por aproximadamente 24 aminoácidos (ELLIS *et al.*, 2000b). Os genes *R* já clonados codificam para proteínas nas quais as LRR's podem repetir-se de 13 a mais de 40 vezes (BENT, 1996; ELLIS *et al.*, 2000b). Em termos de função, tem sido sugerido que o domínio LRR pode participar em interações proteína-proteína (KOBÉ e DEISENHOFER, 1995). A presença desses domínios em proteínas codificadas por genes de resistência sugere que tais proteínas podem interagir direta e/ou indiretamente com o produto do gene de avirulência correspondente ou com outras proteínas que integram as vias de transdução de sinais que conduzem à HR (BENT, 1996; BAKER *et al.*, 1997; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997; WARREN *et al.*, 1998; ELLIS *et al.*, 2000a). A análise da única proteína que apresenta um domínio LRR já cristalizada (proteína inibidora de ribonuclease porcina) revelou que os resíduos "x" estão expostos para a parte externa da proteína, possivelmente determinando interações específicas (KOBÉ e DEISENHOFER, 1995). No caso de proteínas de resistência, uma outra indicação de que os resíduos "x" podem interagir especificamente com produtos de avirulência do patógeno é o fato desses resíduos serem extremamente variáveis em relação aos demais aminoácidos das proteínas *R* (MEYERS *et al.*, 1998; NOEL *et al.*, 1999; ELLIS *et al.*, 2000b).

Os domínios NBS têm sido relatados em diversas proteínas com atividade de ligação a ATP e GTP, como por exemplo, a subunidade β da enzima ATP sintetase, proteínas *ras*, adenilato cinases, entre outras (ALBERTS *et al.*, 1994; TRAUT, 1994; ELLIS *et al.*, 2000b). A presença do domínio NBS nas proteínas *R* sugere que a ligação a nucleotídeos trifosfatados seja essencial para a sua atividade (TRAUT, 1994; BENT, 1996). Apesar dos avanços relacionados à caracterização estrutural dos domínios NBS, pouco ainda se sabe sobre seu papel na ativação das respostas de defesa contra fitopatógenos (BENT, 1996). Sabe-se, no entanto, que os domínios NBS estão presentes em muitas proteínas envolvidas com o processo de apoptose em mamíferos (TRAUT, 1994).

Proteínas com domínios NBS/LRR podem ser separadas em subclasses, de acordo com as características de sua extremidade amino, que pode apresentar domínios LZ, TIR ou ainda domínios sem características bem definidas (ELLIS *et al.*, 2000b).

Domínios LZ apresentam a sequência consenso LxxxYxxL, onde “L” representa o aminoácido leucina, “Y” um aminoácido hidrofóbico e “x” um aminoácido qualquer (BENT, 1996). Esta sequência repete-se quatro vezes, em série. Tem sido proposto que os domínios LZ também favoreçam interações proteína-proteína, devido ao fato de promoverem a formação de estruturas denominadas “coiled-coil” (ALBER, 1992; BENT, 1996). Os LZ’s têm sido observados em muitos fatores de transcrição de eucariotos que atuam na forma de homo ou heterodímeros (BENT, 1996; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997).

Determinados genes *R* codificam para proteínas que apresentam em sua extremidade amino domínios que apresentam similaridade com os domínios citoplasmáticos da proteína Toll de *Drosophilla* e do receptor interleucina-1 (IL-1R) de mamíferos. (BENT, 1996; ELLIS *et al.*, 2000b). Tanto Toll quanto IL-1R têm a função de ativar fatores de transcrição. IL-1R, após interação com IL-1, ativa o fator de transcrição NF- κ B. A proteína Toll participa do controle do desenvolvimento de *Drosophilla*, ativando o fator de transcrição Dorsal. É provável que proteínas *R* com o domínio TIR funcionem de maneira semelhante a Toll e IL-1R (BENT, 1996), ativando vias de transdução de sinais específicas.

O gene *Sw-5*, introgridido no tomateiro cultivado, *Lycopersicon esculentum*, a partir da espécie selvagem *L. peruvianum*, confere ao tomateiro resistência de amplo espectro a tospovírus. *Sw-5* codifica uma proteína com 1246 aminoácidos que pode ser classificada na família de genes *R* que codificam para proteínas que apresentam domínios NBS-LRR (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000). Outros membros desta família são os genes *Mi*, *I2* e *Prf* também do tomateiro, *RPM1*, *RPS2*, *RPS5* e *RPP8* de *Arabidopsis*, *Rx* da batateira, entre outros (BENT, 1996; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997; WARREN *et al.*, 1988; ELLIS *et al.*, 2000b).

Sw-5 é membro de uma família multigênica com membros dispersos nos cromossomos 9 e 12 do tomateiro (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000). Em contraste com vários locos que contêm genes de resistência já caracterizados, o loco *Sw-5*, localizado na região telomérica do cromossomo 9, é um loco simples. Análise de expressão do gene *Sw-5* indica a presença de transcritos de tamanho similares em variedades resistentes e suscetíveis (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000). Portanto, as diferenças de resistência nesses materiais parece não ser devido a diferentes níveis de expressão de *Sw-5*, mas sim por diferenças estruturais nas proteínas codificadas pelos diferentes alelos do loco *Sw-5*.

Vários trabalhos têm relatado fontes de resistência a tospovírus em tomateiro, principalmente nas espécies selvagens *L. peruvianum*, *L. chilense* e *L. hirsutum*. É provável que os genes de resistência presentes nessas fontes sejam alelos do loco *Sw-5*. Todavia, devido a problemas de incompatibilidade com o tomateiro cultivado, é difícil determinar se a resistência desses materiais é devido a alelos do loco *Sw-5* ou a genes localizados em outras regiões do genoma do tomateiro. Com a disponibilidade da sequência do gene *Sw-5*, uma maneira mais rápida para verificar esta possibilidade seria a amplificação dos alelos do loco *Sw-5* presentes nestas espécies e a verificação de sua atividade biológica mediante expressão dessas sequências em plantas suscetíveis. Associada à caracterização molecular, esta estratégia pode fornecer informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na evolução de novas especificidades nesse loco.

No presente trabalho, oligonucleotídeos desenhados para anelarem nas regiões correspondentes ao início e fim da ORF codificada pelo gene *Sw-5* foram utilizados em PCR contendo como molde DNA extraído de plantas de vários genótipos de *L. chilense*, *L. peruvianum*, *L. hirsutum* e *L. esculentum*. Os produtos de PCR resultantes foram clonados e seqüenciados. A comparação dos alelos clonados forneceu evidências sobre a importância dos domínios das proteínas codificadas nos mecanismos de reconhecimento de tospovírus e ativação da cadeia de transdução de sinais mediada pelo gene *Sw-5*. A futura análise funcional alelos do loco *Sw-5* em plantas transgênicas, bem como o estudo de genes quiméricos combinando diferentes domínios dos alelos clonados, deverão fornecer subsídios para uma melhor compreensão das bases moleculares da resistência a tospovírus mediada pelo gene *Sw-5*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amplificação dos alelos do loco *Sw-5*

DNA total de plantas caracterizadas como resistentes ou suscetíveis a tospovírus, pertencentes às espécies *Lycopersicon peruvianum*, *L. chilense*, *L. hirsutum* e *L. esculentum* (Tabela 2, Capítulo 1) foi extraído, empregando-se o protocolo descrito por FULTON *et al.* (1995).

Após a quantificação, 50 ng do DNA de cada amostra foi utilizado como molde em reações de PCR, com a seguinte composição: 50 ng de DNA, 5 µl do tampão de reação 10X, 3 µl de cloreto de magnésio 0,025 M, 1 µl da mistura de desoxinucleotídeos 0,01 M, 1 µl de cada oligonucleotídeo, 2 a 5 unidades do sistema enzimático ElongaseTM (Gibco-BRL) e água destilada estéril suficiente para atingir volume final de 50 µl. As reações de PCR foram compostas de 37 ciclos a: 96°C durante 30 segundos (desnaturação), 56°C por um minuto (anelamento), 68°C por oito minutos (polimerização), seguidos por uma extensão final a 68°C por dez minutos.

O sistema ElongaseTM consiste na mistura de duas DNA's polimerases: *Taq* polimerase e GB-D polimerase. Essa última enzima, proveniente da

bactéria *Pyrococcus* sp., apresenta atividade de correção de erro 3' → 5', característica que aumenta sua processividade e a torna cinco vezes mais precisa que a *Taq* polimerase comercial, que não possui esta atividade.

Inicialmente, para todas as amostras, utilizaram-se duas combinações de oligonucleotídeos: 1958C/19Pst e 1958C/5750. No caso da amostra proveniente da planta 134417-10 de *L. hirsutum*, nenhum produto de PCR foi obtido quando essas duas combinações de oligonucleotídeos foram empregadas. O oligonucleotídeo TCD1FR foi então utilizado em combinação com 1958C. As seqüências destes oligonucleotídeos são apresentadas na Tabela 1. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na seqüência do gene *Sw-5*, com 1958C e 5750 anelando exatamente no início e no fim da ORF codificada pelo gene *Sw-5*, respectivamente. O oligonucleotídeo 19Pst anela numa região localizada a aproximadamente 400 pares de bases após o término da ORF, enquanto o oligonucleotídeo TCD1FR anela cerca de 300 pares de bases antes do códon de terminação do gene *Sw-5* (TGA). Uma representação esquemática mostrando as posições onde os oligonucleotídeos anelam em relação ao gene *Sw-5* é apresentada na Figura 1.

Tabela 1 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR visando amplificação e/ou seqüenciamento de alelos do loco *Sw-5*

Oligonucleotídeo	Finalidade	Seqüência (5'→3')
1958C	Clonagem e seqüenciamento	GGTGATCTAGAAGGGAGAAAATG GCTG
19Pst	Clonagem e seqüenciamento	GCATCTGCAACAATAAGGAG
5750	Clonagem e seqüenciamento	GGGCTAGCAAGTCTAGAGTGGC
TCD1FR	Clonagem	CAACGGAAATGATTACCTCTGAG AC
FP1	Seqüenciamento	CATGTCGGCAAGAACATCAACCG TAGC

FP8	Seqüenciamento	CATCTCTGGTCTTCCAAAACACAG
FP12	Seqüenciamento	AGGATTTGTAGTACGTCTCAACTT G
SwpP3331	Seqüenciamento	ATCTTCAGAGGCGTACCGTC
TCD1FF	Seqüenciamento	CGTTTTGATGTTTCGAGCATGG

Para verificar o sucesso da amplificação específica, bem como para avaliar a concentração do produto de PCR, um volume de 5 µl da reação foi aplicado em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X, contendo brometo de etídio. Os produtos amplificados foram visualizados sob luz ultra-violeta, após corrida eletroforética à voltagem constante de 70 V por 2 horas.

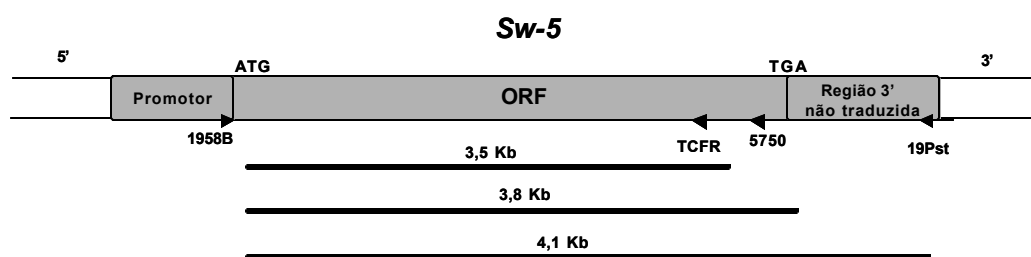


Figura 1 - Representação das posições de anelamento dos oligonucleotídeos 1958B, TCD1FR, 19Pst e 5750, utilizados para amplificar os alelos do loco *Sw-5*. As barras abaixo da representação do gene *Sw-5* representam os produtos de PCR obtidos pela combinação de 1958B com TCD1FR (3,5 kb), 5750 (3,8 kb) e 19Pst (4,1 kb).

2.2. Clonagem dos alelos do loco *Sw-5*

Os fragmentos amplificados por PCR foram diretamente clonados no vetor pGEM-T easy (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de ligação consistiu de 1 µl do vetor, 5 µl do tampão de ligação, 1 µl de T4 DNA ligase, 1 a 3 µl do produto de PCR (aproximadamente 250 ng) e água estéril suficiente para um

volume final de 10 µl. Uma alíquota de 5 µl da reação de ligação foi utilizada para transformar células competentes de *Escherichia coli* estirpe DH5α, utilizando-se o método de transformação por choque térmico (SAMBROOK *et al.*, 1989). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (0,1 µg/mL), IPTG e X-GAL e incubadas a 37°C por 12 horas. Colônias contendo plasmídeos recombinantes foram identificadas pela coloração branca e transferidas para tubos contendo 3 mL de meio LB com ampicilina (0,1 µg/mL). As colônias foram incubadas a 37°C, por 12 horas, sob agitação constante (250 rpm). O DNA plasmidial foi isolado a partir dessas culturas pelo método da lise alcalina, descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). Os plasmídeos foram clivados com a enzima de restrição *EcoR* I que reconhecem as seqüências que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor pGEM-T easy. O DNA clivado foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% em TAE 1X e os fragmentos visualizados sob luz ultra-violeta, após corrida eletroforética à voltagem constante de 100 V por 3 horas.

2.3. Caracterização parcial dos alelos do loco Sw-5 mediante digestão enzimática

Os produtos de PCR obtidos utilizando-se os oligonucleotídeo 1958C/5750 foram clivados com as enzimas de restrição *Rsa* I, *EcoR* I e *Dra* I. As reações de digestão foram realizadas em um volume de 20 µL, contendo 500 ng de DNA, 10U da enzima de restrição, 2µL do tampão 10X correspondente e água destilada estéril. As reações foram incubadas a 37°C durante duas horas.

O DNA clivado foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% em TAE 1X contendo brometo de etídio e os fragmentos visualizados sob luz ultra-violeta, após corrida eletroforética à voltagem constante de 100 V por 3 horas.

2.4. Seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes

Baseando-se na pré-caracterização realizada por clivagem enzimática e na reação a tospovírus das plantas fontes do DNA utilizado na amplificação, dez clones foram selecionados para seqüenciamento (Tabela 2). As seqüências de nucleotídeos dos alelos do loco *Sw-5* foram determinadas em

Tabela 2 - Alelos do loco Sw-5 selecionados para o seqüenciamento

Alelo	Genótipo	Espécie	Reação a tospovírus	Oligonucleotídeos
Sw-5 ^{2*}	MoneyMaker	<i>L. esculentum</i>	Suscetível	1958C/5750
Sw-5 ³	PI 126944-13	<i>L. peruvianum</i>	Suscetível	1958C/5750
Sw-5 ⁴	LA 371-11	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	1958C/5750
Sw-5 ⁵	LA 444/1-19	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	1958C/19Pst
Sw-5 ⁶	PI 134417-10	<i>L. hirsutum</i>	Resistente	1958C/TCFR
Sw-5 ⁷	PI 126944-6	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	1958C/19Pst
Sw-5 ⁸	PI 126944-13	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	1958C/19Pst
Sw-5 ⁹	PI 126928-2	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	1958C/19Pst
Sw-5 ¹⁰	PI 126928-2	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	1958C/19Pst
Sw-5 ¹¹	LA 2753-11	<i>L. chilense</i>	Resistente	1958C/5750

*No presente trabalho, o gene Sw-5, identificado por Stevens (1942) e clonado por Brommoschenkel *et al.* (2000), é referido como alelo Sw-5¹. Os demais alelos receberam um subíndice até 11 de acordo com a ordem de clonagem.

seqüenciador automático Perkin-Elmer modelo ABI 310, utilizando-se o kit “Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing” (Amersham), segundo instruções do fabricante. A estratégia de seqüenciamento consistiu inicialmente em se utilizar

oligonucleotídeos que anelavam em regiões ao longo da ORF codificada pelo gene *Sw-5* (Tabela 1, Figura 2). Adicionalmente, para resolver falhas e ambigüidades de seqüências, a estratégia de subclonagem foi empregada.

Para esta finalidade, os clones foram submetidos a digestões duplas com as enzimas de restrição *Bam*H I/*Eco*R V (B/E) e *Xho* I/*Eco*R V (X/E). O DNA clivado foi aplicado em gel de agarose a 1% em TAE 1 X e submetido à eletroforese a 100 V por duas horas. Os fragmentos de tamanho esperado (1191pb e 1068 pb, respectivamente) foram purificados do gel utilizando-se o

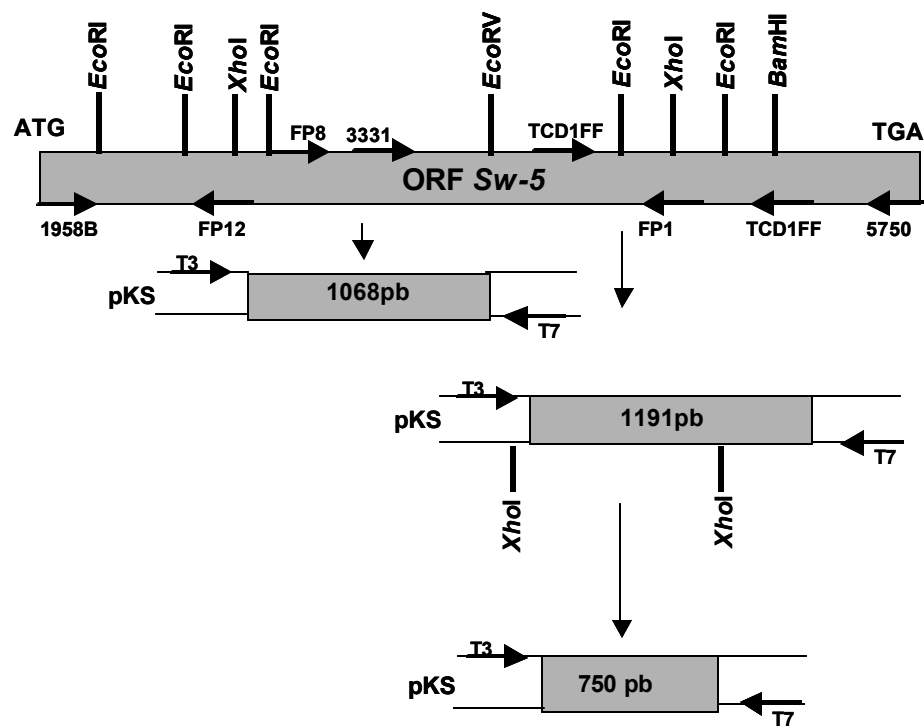


Figura 2 - Estratégias utilizadas para o seqüenciamento dos alelos do loco *Sw-5*. As setas representam as posições de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de seqüenciamento (1958B, FP12, FP8, FP1, TCD1FF, TCD1FR, 5750, T7 e T3). Os fragmentos *Xho*I/*Eco*RV e *Eco*RV/*Bam*HI (E/B) foram liberados do vetor “pGEM-T easy”, purificados do gel e ligados no vetor pBKS. Os subclones que continham os fragmentos E/B foram digeridos com *Xho* I e o fragmento resultante ligado em pBKS. Os oligonucleotídeos T3 e T7, que anelam no vetor pBKS, foram utilizados no seqüenciamento dos subclones gerados a partir de cada um dos 10 alelos do loco *Sw-5*. Os sítios da enzima *Eco*R I, utilizada para verificar o êxito das clonagens, também são indicados no esquema.

kit “ConcertTM Rapid Gel Extraction System” (GIBCO-BRL) e ligados no vetor pBluescript (pBKS) (Promega) previamente digerido com B/E X/E, respectivamente. As ligações foram realizadas num volume de 10 µL, contendo uma relação 3:1 entre insertos e vetor, na presença de 1U da enzima T4 DNA ligase. A reação de ligação foi mantida a 14°C por 16 horas. Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação foi empregada para transformar células competentes de *E. coli* estirpe DH-5α, conforme descrito no item 2.2. O êxito da clonagem foi verificado, mediante digestão com a enzima *EcoR* I. Os clones contendo o inserto B/E foram clivados com *Xho* I, liberando um fragmento em torno de 750 pb, o qual foi purificado do gel e ligado no vetor pBKS previamente digerido com *Xho* I e desfosforilado com fosfatase alcalina.

Utilizando-se os oligonucleotídeos T3 e T7, que anelam em regiões localizadas adjacientemente ao sítio múltiplo de clonagem do vetor pBKS, foram seqüenciados os fragmentos E/B (1191pb), X/E

(1068pb) e *Xho* I (750 pb), a partir de ambas extremidades de cada inserto. Uma representação das estratégias de seqüenciamento utilizadas nesse trabalho pode ser observada na Figura 2.

2.5. Análise das seqüências

As seqüências dos alelos foram comparadas entre si ou com seqüências depositadas em bancos de dados (GenBank e EMBL) utilizando-se, respectivamente, os programas DNAMAN 4.0 e BLAST N (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>).

3. RESULTADOS

3.1. Amplificação dos alelos do loco *Sw-5*

Empregando-se oligonucleotídeos desenhados com base na seqüência do gene *Sw-5*, foram amplificadas, mediante PCR, seqüências alélicas a partir do DNA extraído de plantas pertencentes a diferentes acessos das espécies *L. peruvianum*, *L. chilense*, *L. hirsutum* e *L. esculentum*. A reação destas plantas a tospovírus (resistência ou suscetibilidade) fora previamente determinada (Tabela 2, Capítulo 1). A combinação dos oligonucleotídeos 1958C e 19Pst resultou na amplificação de um fragmento de aproximadamente 4,1 kb a partir de amostras de DNA extraídas das plantas LA 1969-6, PI 126928-2, 126944-6, LA 371-11 e SW99-1. Quando os oligonucleotídeos 1958C e 5750 foram empregados em PCR um fragmento de aproximadamente 3,7 kb foi obtido em 13 das 14 amostras testadas (Figura 3). A única exceção foi a amostra de DNA proveniente da planta 134417-10 de *L. hirsutum*. Para esse material, um fragmento de aproximadamente 3,5 kb foi obtido utilizando-se os oligonucleotídeos 1958C e TCD1FR.

Tabela 3 - Procedência do DNA, oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para amplificação dos alelos do loco *Sw-5* e produtos de PCR escolhidos para clonagem

Genótipo	Espécie	Reação a tospovírus	Oligonucleotídeos		
			1958C/19Pst	1958C/5750	1958C/TCFR
LA 2753-11	Lycopersicon chilense	Resistente	- ¹	+	Nt
LA 1969-3	<i>L. chilense</i>	Suscetível	-	+	Nt
LA 1969-6	<i>L. chilense</i>	Suscetível	+	+	Nt
LA 130-1	<i>L. chilense</i>	Resistente	-	+	Nt
LA 130-5	<i>L. chilense</i>	Resistente	-	+	Nt
PI 126928-2	L. peruvianum	Resistente	+	+	Nt
PI 126928-17	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	-	+	Nt
PI 126944-13	<i>L. peruvianum</i>	Suscetível		+	Nt
PI 126944-6	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	+	+	Nt
LA 444/1-19	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	+	+	Nt
LA 371-11	<i>L. peruvianum</i>	Resistente	-	+	Nt
PI 1344 17-10	L. hirsutum	Resistente	-	-	+
Moneymaker	L. esculentum	Suscetível	-	+	Nt
SW99-1	L. esculentum	Resistente	+	+	Nt

¹- = Nenhum produto de amplificação foi obtido. + = Amplificação positiva. Nt = Combinação de oligonucleotídeos não testada para essas amostras. Os produtos de PCR identificados por um asterisco (*) foram escolhidos para ligação no vetor pGEM-T easy.



Figura 3 - Fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos 1958C/5750, desenhados com base na sequência do alelo *Sw-5*¹ e resolvidos em gel de agarose a 1% em TAE 1X. Amostras de DNA proveniente de *Lycopersicon chilense* – canaletas de 1 a 5. 1 – LA 1969-6, 2 – LA 1969-3, 3- LA 130-5, 4 - LA 130-1, 5 – LA 2753-11. Amostras de *L. peruvianum* – canaletas de 6 a 11. 6 – PI 126944-6, 7 – PI 126944-13, 8 – PI 212407-17, 9 – LA 444/1-19, 10 – LA 371-11, 11 – PI 126928-2. Canaleta 12 – amostra da planta PI 134417-10 de *L. hirsutum*. Canaletas 13 e 14 –SW99-1 e ‘Moneymaker’, respectivamente. M – marcador de comprimento de DNA (1 kb DNA Ladder – Gibco-BRL).

3.2. Caracterização parcial dos alelos do loco *Sw-5* mediante digestão enzimática

A clivagem dos produtos de PCR gerados com os oligonucleotídeos 1958C/5750 com a enzima *Dra* I resultou em padrões de restrição idênticos para todas as amostras (dados não mostrados), enquanto que as clivagens com as enzimas *Rsa* I e *EcoR* I (dados não-mostrados) revelaram grande polimorfismo entre os produtos de amplificação (Figura 4).

3.3. Clonagem e caracterização molecular de alelos do loco *Sw-5*

Um total de 14 produtos de PCR, provenientes de diferentes genótipos de *Lycopersicon* spp., foram clonados no vetor pGemT-easy (Tabela 3). Entre

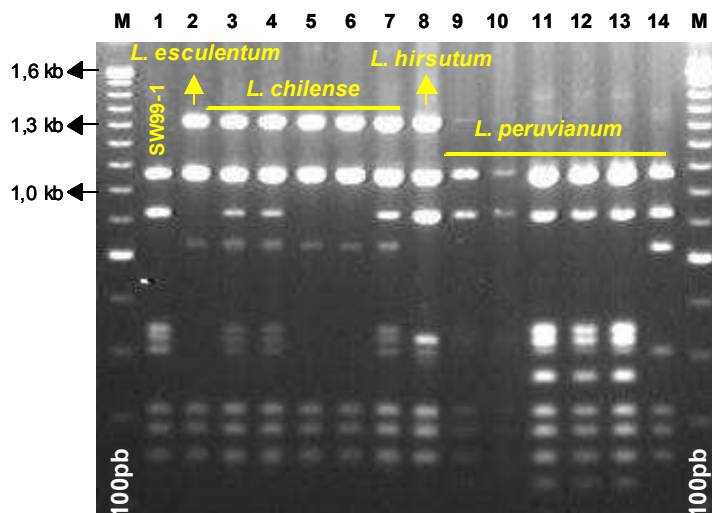


Figura 4 - Padrões de restrição obtidos após clivagem do DNA amplificado de plantas de *Lycopersicon* spp. com a enzima *Rsa* I. Os fragmentos foram resolvidos em gel de agarose a 2 % em TAE 1X. Da esquerda para direita: SW99-1, MoneyMaker, LA 1969-6, LA 1969-3, LA 130-5, LA 130-1, LA 2753-11, PI 134417, PI 126944-13, PI 126944-13, PI 212407-17, LA 444/1-19, LA 371-11, PI 126928-2. Canaletas 13 e 14 –SW99-1 e ‘MoneyMaker’, respectivamente. M – marcador (100 pb DNA Ladder).

estes produtos de PCR foram identificados 16 alelos do loco *Sw-5*, uma vez que dois alelos distintos foram identificados entre os produtos de PCR provenientes das plantas PI 126944-6 e PI 126928-2. A identificação de alelos distintos no mesmo produto de amplificação foi possível devido primeiramente aos diferentes padrões de restrição obtidos com a enzima *EcoR* I (Figura 5) e depois confirmada mediante seqüenciamento. No presente trabalho o *Sw-5*, identificado por Stevens (1942) e clonado por Brommoschenkel *et al.* (2000) é referido como alelo *Sw-5*¹. Os demais alelos receberam um subíndice até 11 de acordo com a ordem de clonagem.

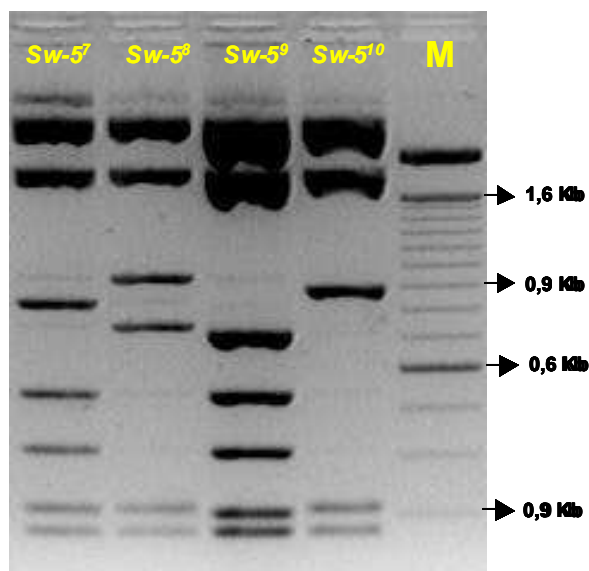


Figura 5 - Padrão de digestão dos clones contendo os alelos *Sw-5*⁷, *Sw-5*⁸, *Sw-5*⁹, *Sw-5*¹⁰ com a enzima *EcoR* I. Os alelos *Sw-5*⁷ e *Sw-5*⁸ são originários do mesmo produto de PCR, obtido da planta PI 126944-6. Os alelos *Sw-5*⁹ e *Sw-5*¹⁰ foram obtidos a partir da planta PI 126928-2. M – marcador (1 kb DNA Ladder).

Baseando-se nos padrões de restrição obtidos para as enzimas *EcoR* I e *Rsa* I, 10 alelos foram selecionados para o seqüenciamento (Tabela 2). Seis alelos (*Sw-5*², *Sw-5*³, *Sw-5*⁴, *Sw-5*⁷, *Sw-5*⁹ e *Sw-5*¹¹) foram completamente seqüenciados, enquanto que os alelos *Sw-5*⁵, *Sw-5*⁶, *Sw-5*⁸ e *Sw-5*¹⁰ foram seqüenciados de maneira parcial (Figura 6).

A análise de seqüenciamento revelou que o alelo *Sw-5*¹⁰ é um produto de PCR truncado, não possuindo uma região de aproximadamente 600 pares de bases da região correspondente à extremidade carboxi-terminal da proteína. O alelo *Sw-5*⁶ também codifica uma OFR incompleta, pois um dos oligonucleotídeos utilizado na sua amplificação (TCD1FR), anela cerca de 300 pares de base antes do fim da ORF.

	A	B	C	D	E	F	G
Sw-5¹	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5²	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5³	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5⁴	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5⁵	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5⁶	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5⁷	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5⁸	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5⁹	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5¹⁰	N-ter		LZ		NBS		LRR
Sw-5¹¹	N-ter		LZ		NBS		LRR

Figura 6 - Representação das regiões seqüenciadas (coloração cinza) nos diferentes alelos do loco *Sw-5*. As áreas de coloração branca correspondem às regiões não seqüenciadas. O alelo *Sw-5¹* também está representado. A = Extremidade amino (N-ter). B = região entre a extremidade amino e o LZ ("Leucine zipper"). C = LZ. D = Região entre o LZ e o NBS ("nucleotide binding site"). E = NBS. F = Região entre o NBS e as LRR's ("leucine rich repeats"). G = LRR's. As seqüências de aminoácidos deduzidas correspondentes a cada região encontram-se na Figura 7.

Considerando-se a ORF completa a similaridade entre os alelos *Sw-5¹*, *Sw-5²*, *Sw-5³*, *Sw-5⁷*, *Sw-5⁹* e *Sw-5¹¹* variou de 91,3 % a 96,6%, ao nível de aminoácidos (Tabela 4).

Tabela 4 - Percentual de similaridade, ao nível de aminoácidos, entre os alelos do loco *Sw-5* considerando-se a ORF completa

	<i>Sw-5¹</i>	<i>Sw-5²</i>	<i>Sw-5³</i>	<i>Sw-5⁴</i>	<i>Sw-5⁷</i>	<i>Sw-5⁹</i>
<i>Sw-5¹</i>	-					
<i>Sw-5²</i>	95,5	-				
<i>Sw-5³</i>	96,6	94,3	-			
<i>Sw-5⁴</i>				-		
<i>Sw-5⁷</i>	95,9	95,2	95,3		-	
<i>Sw-5⁹</i>	95,0	92,5	93,8		93,9	-
<i>Sw-5¹¹</i>	93,9	92,7	95,3		92,9	

Quando comparações de seqüências foram realizadas baseando-se nos domínios que compõem o gene *Sw-5* isoladamente, verificou-se que as regiões mais divergentes foram a extremidade amino e as LRR's (Tabelas 5 e 6, respectivamente). No caso da extremidade amino, a identidade variou de 81,9 % a 96,0 %, enquanto que para as LRR's a variação observada foi ligeiramente menor (86,8 % a 95, 8%). Maiores valores de similaridade foram verificados para o domínio NBS (93,6 a 100 %) (Tabela 7).

O alinhamento das seqüências obtidas revelou que a divergência de seqüência dos alelos analisados é devida a substituições de aminoácidos distribuídas de maneira não uniforme e deleções de 1 a 5 aminoácidos (Figura 7). As substituições estão concentradas na região amino-terminal (Figura 7A) e na região que contém as LRRs (Figura 7G). Todos os alelos apresentam seqüências consenso idênticas para os domínios LZ (Figura 7B) e subdomínios "P-loop", cinase 3 e HD (Figura 7E). O alelo *Sw-5²* difere dos demais no domínio cinase 2A, por apresentar o aminoácido valina ao invés de ácido aspártico na seqüência consenso (substituição não-sinônima). Todos os alelos possuem 18 LRRs. À exceção do alelo *Sw-5²*, todos os demais

Tabela 5 - Percentual de similaridade, ao nível de aminoácidos, entre os alelos do loco *Sw-5* considerando-se a extremidade amino

	<i>Sw-5</i> ¹	<i>Sw-5</i> ²	<i>Sw-5</i> ¹¹	<i>Sw-5</i> ³	<i>Sw-5</i> ⁴	<i>Sw-5</i> ⁶	<i>Sw-5</i> ⁷	<i>Sw-5</i> ⁸	<i>Sw-5</i> ⁹
<i>Sw-5</i> ¹	-								
<i>Sw-5</i> ²	92,9	-							
<i>Sw-5</i> ¹¹	91,6	86,7	-						
<i>Sw-5</i> ³	95,6	89,4	93,8	-					
<i>Sw-5</i> ⁴	91,6	89,8	?	?	-				
<i>Sw-5</i> ⁶	96,0	89,8	87,6	91,6	?	-			
<i>Sw-5</i> ⁷	91,6	89,8	85,8	88,5	89,8	89,8	-		
<i>Sw-5</i> ⁸	94,2	90,7	88,5	92,0	92,0	89,8	93,8	-	
<i>Sw-5</i> ⁹	86,3	83,6	81,9	84,5	88,0	83,6	82,7	84,5	-
<i>Sw-5</i> ¹⁰	94,7	87,6	88,0	92,0	90,7	91,6	88,0	90,7	84,5

Tabela 6 - Percentual de similaridade, ao nível de aminoácidos, entre os alelos do loco *Sw-5* considerando-se as repetições ricas em leucina (LRR)

	<i>Sw-5</i> ¹	<i>Sw-5</i> ²	<i>Sw-5</i> ¹¹	<i>Sw-5</i> ³	<i>Sw-5</i> ⁴	<i>Sw-5</i> ⁵
<i>Sw-5</i> ¹	-					
<i>Sw-5</i> ²	94,5	-				
<i>Sw-5</i> ¹¹	91,9	91,5	-			
<i>Sw-5</i> ³	95,5	93,8	95,8	-		
<i>Sw-5</i> ⁴	94,8	92,3	95,2	94,2	-	
<i>Sw-5</i> ⁵	90,3	87,1	87,1	86,8	88,7	-
<i>Sw-5</i> ⁹	93,8	89,7	89,0	91,6	91,6	91,6

Tabela 7 - Percentual de similaridade, ao nível de aminoácidos, entre os alelos do loco *Sw-5* considerando-se o domínio NBS ("Nucleotide Binding Site")

	<i>Sw-5¹</i>	<i>Sw-5²</i>	<i>Sw-5¹¹</i>	<i>Sw-5³</i>	<i>Sw-5⁴</i>	<i>Sw-5⁵</i>	<i>Sw-5⁶</i>	<i>Sw-5⁷</i>	<i>Sw-5⁸</i>	<i>Sw-5⁹</i>
<i>Sw-5¹</i>	-									
<i>Sw-5²</i>	98,3	-								
<i>Sw-5¹¹</i>	94,2	94,2	-							
<i>Sw-5³</i>	97,7	96,5	96,5	-						
<i>Sw-5⁴</i>	97,1	95,4	95,9	97,1	-					
<i>Sw-5⁵</i>	98,8	97,1	93,6	96,5	96,5	-				
<i>Sw-5⁶</i>	97,7	97,1	93,0	95,9	95,9	97,7	-			
<i>Sw-5⁷</i>	98,3	98,8	94,8	96,5	95,9	98,3	98,3	-		
<i>Sw-5⁸</i>	98,3	98,8	94,8	96,5	95,9	98,3	98,3	100,0	-	
<i>Sw-5⁹</i>	98,8	97,1	93,6	96,5	96,5	100,0	97,7	98,3	98,3	-
<i>Sw-5¹⁰</i>	99,4	97,7	93,6	97,1	96,5	98,3	97,1	97,7	97,7	98,3

A

Sw-5¹ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5² 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5³ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5⁴ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5⁵ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5⁶ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5⁷ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5⁸ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5¹⁰ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76
Sw-5¹¹ 1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLWDILRIIEEEMVLRVFTFTKYHDVLLPDSLVELTKRAKLTGEILHRVLGRI 76

Sw-5¹ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5² 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5³ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5⁴ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5⁵ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5⁶ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5⁷ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5⁸ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5¹⁰ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152
Sw-5¹¹ 77 PHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMDCLNFDVLMFLQKDRFFHSREQLAKHRSI 152

Sw-5¹ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5² 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5³ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5⁴ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5⁵ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5⁶ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5⁷ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5⁸ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5¹⁰ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226
Sw-5¹¹ 153 KELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYEKQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSKPPYLL.. 226

Figura 7 - Sequências de aminoácidos deduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos dos alelos do loco *Sw-5*. As substituições em relação ao alelo *Sw-5¹* são destacadas em vermelho. Códon de terminação prematuros são representados por asterisco (*) e deleções por pontos (.). 7A – Extremidade amino. 7B – Região entre a extremidade amino e o domínio LZ (“Leucine zipper”). 7C – Domínio LZ. Os resíduos de L ou I do consenso xxxxxxL estão destacados em negrito. 7D – Região entre o LZ e o NBS (“Nucleotide binding

site”). 7E – NBS. Os subdomínios “P-loop”, cinase 2A, cinase 3A e HD estão sublinhados. 7F – Região entre o NBS e as LRR’s (“Leucine rich repeats”). 7G – Extremidade carboxi, que compreende as LRR’s. As repetições do consenso “LxxLxLxx” estão numeradas acima da sequência. Os resíduos L ou outros resíduos alifáticos estão destacados em negrito dentro do consenso.

B

SW-5 ¹	227	SLIVLVELEMKKIFHGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLHNLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLLVF	302
SW-5 ²	227	SLIVFVELEMKKLFHGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLHNLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLLVF	302
SW-5 ³	227	SLIVLVELEMKKIFHGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLHNLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLLVF	302
SW-5 ⁴	227	SLIVLVELEMKKIFHGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLHNLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLLVF	302
SW-5 ⁵	227	SLIVFVELEMKKIFHGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLHNLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLLVF	302
SW-5 ⁶	227	SLIVFVELEMKKIFHGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLHNLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLLVF	302
SW-5 ¹¹	227	SLIVLVELEMKKIFHGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSSHLHNLLMYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLLVF	302
SW-5 ¹	303	LDADVSNHVGINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRISINKDETSNISLCSIQILEKTKDLKAQVETYYKSLKF	378
SW-5 ²	303	LDADVSNHVGINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRISINKDETSNISLCSIQILEKTKDLKAQVETYYKSLKF	378
SW-5 ³	303	LDADVSNHVGINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRISINKDETSNISLCSIQILEKTKDLKAQVETYYKSLKF	378
SW-5 ⁴	303	LDADVSNHVGINGNWLKEVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRISINKDETSNISLCSIQILEKTKDLKAQVETYYKSLKF	378
SW-5 ⁷	303	LDADVSNHVGINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRISINKDETSNISLCSIQILEKTKDLKAQVETYYKSLKF	378
SW-5 ⁸	303	LDADVSNHVGINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRISINKDETSNISLCSIQILEKTKDLKAQVETYYKSLKF	378
SW-5 ⁹	303	LDADVSNHVGINGNWLKEVLLKVAIAGDILYVIQKLLPRISINKDETSNISLCSIQILEKTKDLKAQVETYYKSLKC	378
SW-5 ¹¹	303	LDADVSNHVGINGNWLKEVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPISINKDENISLCSIQILKTKDLKAQVETYYKSLKF	378
SW-5 ¹	379	TPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNMSTSKSG	408
SW-5 ²	379	TPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNMSTSKSG	408
SW-5 ³	379	TPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNMSTSKSG	408
SW-5 ⁴	379	TPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNMSTSKSG	408
SW-5 ⁷	379	TPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNMSTSKSG	408
SW-5 ⁸	379	TPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNMSTSKSG	408
SW-5 ⁹	379	TPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNMSTSKSG	408
SW-5 ¹¹	379	TPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNMSTSKSG	408

C

SW-5 ¹	409	LGFLMKPLLGNLEKELSSLSI LEKELSS I	438
SW-5 ²	409	LGFLMKPLLGNLEKELSSLSI LEKELSS I	438
SW-5 ³	409	LGFLMKPLLGNLEKELSSLSI LEKELSS I	438
SW-5 ⁴	409	LGFLMKPLLGNLEKELSSLSI LEKELSS I	438
SW-5 ⁷	409	LGFLMKPLLGNLEKELSSLSI LEKELSS I	438
SW-5 ⁹	409	LGFLMKPLLGNLEKELSSLSI LEKELSS I	438
SW-5 ¹⁰	409	LGFLMKPLLGNLEKELSSLSI LEKELSS I	438
SW-5 ¹¹	409	LGFLMKPLLGNLEKELSSLSI LEKELSS I	438

D

SW-5 ¹	439	FRDVVHHEHNIPKDLQRRITINLSYEA EVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYV	514
SW-5 ²	439	FRDVVHHEHNIPKDLQRRITINLACEA EVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYV	514
SW-5 ³	439	FRDVVHHEHNIPKDLQRRITIN*SYEA EVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTILKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYV	514
SW-5 ⁴	439	FRDVVHHEHNIPKDLQRRITINL AYEAEVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTILKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYV	514
SW-5 ⁷	439	FSDVVHHEHTIPKDLQRRITINL AYEAEVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWLADIPLNPHYV	514
SW-5 ⁸	439	FRDVVHHEHTIPKDLQRRITINL AYEAEVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWLADIPLNPHYV	514
SW-5 ⁹	439	FRDVVHHEHNIPKDLQRRITINL VYEAEVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYV	514
SW-5 ¹⁰	439	FSDVVHHEHTIPKDLQRRITINL AYEAEVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTIVKEIKQINAEVTEMWLADIPLNPHYV	514
SW-5 ¹¹	439	FRDVVHHEHTIPKDLQRRITINL AYEAEVAIDSILAQYNAFLHIFCSLPTILKEIKQINAEVTEMWSADIPLNPHYV	514
SW-5	515	AAPLKHLPDRHSNLVTDEEVGFENKAEELIDYLRGTNELDVVPIV	561
SW-5MM	515	AAPLKHLPDRHSNLVTDEEVGFENKAEELIDYLRGTNELDVVPIV	561
SW-5-1	515	AAPLKHLPDRHSNLVTDEEVGFENKAEELIDYLRGTNELDVVPIV	561

Sw-5-2	515	AAPLKHL	PDRHSNLVTDEEV	VG	FENKAEELIDYLIRGTNELDVVPIV	561	
		Sw-5-5	515	AAPLK	YLPDRHSNLVTDEEV	VG	FENKAEELIDYLIRGTNELDVVPIV
Sw-5-6	515	AAPLK	YLPDRHSNLVTDEEV	VG	FENKAEELIDYLIRGTNELDVVPIV	561	
		Sw-5-7	515	AAPLKHL	PDRHSNLVTDEEV	VG	FENKAEELIDYLIRGTNELDVVPIV
Sw-5-8	515	AAPLK	YLPDRHSNLVTDEEV	VG	FENKAEELIDYLIRGTNELDVVPIV	561	
Sw-5-9	515	AAPLKHL	PDRHSNLVTDEEV	VG	FENKAEELIDYLIRGTNELDVVPIV	561	

Figura 7, continuação.

E

<i>P-loop</i>			
<i>Sw-5</i> ¹	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTGSDDNNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ²	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTG <u>F</u> NDNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ³	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLY <u>Y</u> NDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTGVDNNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ⁴	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLY <u>Y</u> NDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTGSDDNNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ⁵	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYN <u>Q</u> RELLQDIFSQVTGSDDNNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ⁶	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLYNNDI <u>A</u> SRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTG <u>F</u> NDNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ⁷	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTG <u>F</u> NDNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ⁸	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTG <u>F</u> NDNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ⁹	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYN <u>Q</u> RELLQDIFSQVTGSDDNNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ¹⁰	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTGSDDNNGATVDVLADMLRRKLMGKRY	636
<i>Sw-5</i> ¹¹	562	<u>GMGGQGKTTI</u> ARKLY <u>Y</u> NDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRRELLQDIFSQVTG <u>V</u> NDNGATVD <u>D</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>L</u> RRKLMGKRY	636

<i>Cinase 2A</i>		<i>Cinase 3A</i>	
<i>Sw-5</i> ¹	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDDGIR <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ²	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDDGIR <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ³	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDDGIR <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ⁴	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDP <u>SGNR</u> <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ⁵	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDP <u>VGIR</u> <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ⁶	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDP <u>VGIR</u> <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ⁷	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDP <u>VGIR</u> <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ⁸	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDP <u>VGIR</u> <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ⁹	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDP <u>VGIR</u> <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ¹⁰	637	<u>LTVLDD</u> <u>M</u> *DCMVWDDLRLSFDDGIR <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713
<i>Sw-5</i> ¹¹	637	<u>LTVLDD</u> MWDCMVWDDLRLSFDP <u>SGNR</u> <u>SRIVVTTR</u> LEEVGKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPE	713

<i>HD</i>			
<i>Sw-5</i> ¹	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ²	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ³	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ⁴	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ⁵	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ⁶	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ⁷	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ⁸	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ⁹	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ¹⁰	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733
<i>Sw-5</i> ¹¹	714	LQDVSQAVAEKC <u>KGLPLVVVL</u>	733

F

<i>Sw-5</i> ¹	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYLDSEFEESLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ²	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYLDSEFEESLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ³	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYIDSEFE.....MQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ⁴	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYIDSEYEEYSLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ⁵	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYLDSEFEESLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ⁶	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYLDSEFEESLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ⁷	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYLDSEFEESLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ⁸	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYLDSEFEESLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ⁹	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYLDSEFEESLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ¹⁰	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYLDSEFEESLATMQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799
<i>Sw-5</i> ¹¹	734	VAGIIKKRKMEESWNEVKDALFDYIDSEFEY...MQLSFDNLPHCLKPCLLYMGMFSEDARIP	799

Figura 7, continuação.

G

SW-5 ¹	800	ASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEAEGYLMDLISSNLVMSKRTYKGRVKYQVHVDVHHFCLEKSREAKFMLA	875
SW-5 ²	800	ASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEAEGYLMDLISSNLVMSKRTYKGRVKYQVHVDVHHFCLEKSREAKFMLA	875
SW-5 ³	800	ASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEAEGYLMDLISSNLVMSKRTYKGRVKYQVHVDVHHFCLEKSREAKFMLA	875
SW-5 ⁴	800	ASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEAEGYLMDLISSNLVMSKRTYKGRVKYQVHVDVHHFCLEKSREAKFMLA	875
SW-5 ⁵	800	ASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEAEGYLMDLISSNLVMSKRTYKGRVKYQVHVDVHHFCLEKSREAKFMLA	875
SW-5 ⁹	800	ASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEAEGYLMDLISSNLVMSKRTYKGRVKYQVHVDVHHFCLEKSREAKFMLA	875
SW-5 ¹¹	800	ASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEAEGYLMDLISSNLVMSKRTYKGRVKYQVHVDVHHFCLEKSREAKFMLA	875
SW-5 ¹	876	VKGOYIHFQPSDWKGRVVSFSEELSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRASINDIFSCQISELRLLKVLDSL	919
SW-5 ²	876	VKGOYIHFQPSDWKGRVVSFSEELSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRASINDIFSCQISELRLLKVLDSL	919
SW-5 ³	876	VKGOYIHFQPSDWKGRVVSFSEELSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRASINDIFSCQISELRLLKVLDSL	919
SW-5 ⁴	876	VKGOYIHFQPSDWKGRVVSFSEELSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRASINDIFSCQISELRLLKVLDSL	919
SW-5 ⁵	876	VKGOYIHFQPSDWKGRVVSFSEELSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRASINDIFSCQISELRLLKVLDSL	919
SW-5 ⁹	876	VKGOYIHFQPSDWKGRVVSFSEELSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRASINDIFSCQISELRLLKVLDSL	919
SW-5 ¹¹	876	VKGOYIHFQPSDWKGRVVSFSEELSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRASINDIFSCQISELRLLKVLDSL	919
SW-5 ¹	920	SYIVEFLSLATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPYYDILLPVSWFWMKKLRHAHFGKAEDK	995
SW-5 ²	920	SYIVEFLSLATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPYYDILLPVSWFWMKKLRHAHFGKAEDK	995
SW-5 ³	920	SYIVEFLSLATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPYYDILLPVSWFWMKKLRHAHFGKAEDK	995
SW-5 ⁴	920	SYIVEFLSLATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPYYDILLPVSWFWMKKLRHAHFGKAEDK	995
SW-5 ⁵	920	SYIVEFLSLATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPYYDILLPVSWFWMKKLRHAHFGKAEDK	995
SW-5 ⁷	920	SYIVEFLSLATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPYYDILLPVSWFWMKKLRHAHFGKAEDK	995
SW-5 ⁹	920	SYIVEFLSLATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPYYDILLPVSWFWMKKLRHAHFGKAEDK	995
SW-5 ¹¹	920	SYIVEFLSLATFKPLNQLKYLAVQAFEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPYYDILLPVSWFWMKKLRHAHFGKAEDK	995
SW-5 ¹	996	QGLSEGSSKLENRLIKNIVGFDRVDLSRRCPNLQOLQITYFGNNEEPFCPKLENLTQLQOLQSFARPRTLSS	1070
SW-5 ²	996	QGLSEGSSKLENRLIKNIVGFDRVDLSRRCPNLQOLQITYFGNNEEPFCPKLENLTQLQOLQSFARPRTLSS	1070
SW-5 ³	996	QGLSEGSSKLENRLIKNIVGFDRVDLSRRCPNLQOLQITYFGNNEEPFCPKLENLTQLQOLQSFARPRTLSS	1070
SW-5 ⁴	996	QGLSEGSSKLENRLIKNIVGFDRVDLSRRCPNLQOLQITYFGNNEEPFCPKLENLTQLQOLQSFARPRTLSS	1070
SW-5 ⁵	996	QGLSEGSSKLENRLIKNIVGFDRVDLSRRCPNLQOLQITYFGNNEEPFCPKLENLTQLQOLQSFARPRTLSS	1070
SW-5 ⁷	996	QGLSEGSSKLENRLIKNIVGFDRVDLSRRCPNLQOLQITYFGNNEEPFCPKLENLTQLQOLQSFARPRTLSS	1070
SW-5 ⁹	996	QGLSEGSSKLENRLIKNIVGFDRVDLSRRCPNLQOLQITYFGNNEEPFCPKLENLTQLQOLQSFARPRTLSS	1070
SW-5 ¹¹	996	QGLSEGSSKLENRLIKNIVGFDRVDLSRRCPNLQOLQITYFGNNEEPFCPKLENLTQLQOLQSFARPRTLSS	1070
SW-5 ¹	1071	LQLPNSLNKLVLLEGH. IESVIPFIAGLPSLEYLQLDVCFQSQSEEWCLGDTTFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEE	1145
SW-5 ²	1071	LQLPNSLNKLVLLEGH. IESVIPFIAGLPSLEYLQLDVCFQSQSEEWCLGDTTFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEE	1145
SW-5 ³	1071	LQLPNSLNKLVLLEGH. IESVIPFIAGLPSLEYLQLDVCFQSQSEEWCLGDTTFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEE	1145
SW-5 ⁴	1071	LQLPNSLNKLVLLEGH. IESVIPFIAGLPSLEYLQLDVCFQSQSEEWCLGDTTFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEE	1145
SW-5 ⁵	1071	LQLPNSLNKLVLLEGH. IESVIPFIAGLPSLEYLQLDVCFQSQSEEWCLGDTTFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEE	1145
SW-5 ⁷	1071	LQLPNSLNKLVLLEGH. IESVIPFIAGLPSLEYLQLDVCFQSQSEEWCLGDTTFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEE	1145
SW-5 ⁹	1071	LQLPNSLNKLVLLEGH. IESVIPFIAGLPSLEYLQLDVCFQSQSEEWCLGDTTFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEE	1145
SW-5 ¹¹	1071	LQLPNSLNKLVLLEGH. IESVIPFIAGLPSLEYLQLDVCFQSQSEEWCLGDTTFHKLKLLKLVKLNISRWDVSEE	1145
SW-5 ¹	1046	SFPLLETLVIKKCIDLEEFPLSFADIPTLEQIKLTGSWKVSLSDSAVRMKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSDSDSAVR	1219
SW-5 ²	1046	SFPLLETLVIKKCIDLEEFPLSFADIPTLEQIKLTGSWKVSLSDSAVRMKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSDSDSAVR	1219
SW-5 ³	1046	SFPLLETLVIKKCIDLEEFPLSFADIPTLEQIKLTGSWKVSLSDSAVRMKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSDSDSAVR	1219
SW-5 ⁴	1046	SFPLLETLVIKKCIDLEEFPLSFADIPTLEQIKLTGSWKVSLSDSAVRMKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSDSDSAVR	1219
SW-5 ⁵	1046	SFPLLETLVIKKCIDLEEFPLSFADIPTLEQIKLTGSWKVSLSDSAVRMKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSDSDSAVR	1219
SW-5 ⁷	1046	SFPLLETLVIKKCIDLEEFPLSFADIPTLEQIKLTGSWKVSLSDSAVRMKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSDSDSAVR	1219
SW-5 ⁹	1046	SFPLLETLVIKKCIDLEEFPLSFADIPTLEQIKLTGSWKVSLSDSAVRMKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSDSDSAVR	1219
SW-5 ¹¹	1046	SFPLLETLVIKKCIDLEEFPLSFADIPTLEQIKLTGSWKVSLSDSAVRMKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSDSDSAVR	1219
SW-5 ¹	1220	MKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSD	1246
SW-5 ²	1220	MKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSD	1246
SW-5 ³	1220	MKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSD	1246
SW-5 ⁴	1220	MKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSD	1246
SW-5 ⁵	1220	MKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSD	1246
SW-5 ⁷	1220	MKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSD	1246
SW-5 ⁸	1220	MKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSD	1246
SW-5 ¹¹	1220	MKEEIKDTEGCDRLHLVKQRSD	1246

Figura 7, continuação.

apresentam sequência consenso das LRRs idênticas (Figura 7G). As repetições 9 e 16 deste alelo são diferentes dos demais, devido à substituição de um aminoácido na sequência consenso da LRR.

No total, os alelos *Sw-5*¹ (alelo funcional) e *Sw-5*² (não-funcional), diferem em 54 substituições ao nível de aminoácidos ao longo de toda a ORF. Dessas substituições, 14 são não-sinônimas (levam a mudança de carga do aminoácido substituído). A grande maioria destas substituições se concentra na extremidade amino (sete) e nas LRR's (seis). A outra substituição não-sinônima, já descrita anteriormente, se localiza no subdomínio cinase 2A do domínio NBS.

Os clones *Sw-5-1* e *Sw-5-8* apresentam ORF's interrompidas por um códon de terminação prematuro nas posições que correspondem aos aminoácidos 460 (Figura 7D) e 644 (Figura 7E) da ORF do gene *Sw-5*, respectivamente.

Além da região codificadora, uma sequência de aproximadamente 300 pares de bases da região 3' não traduzida, de quatro alelos, foi analisada. Como observado na Figura 8, os alelos comparados também apresentam alta similaridade para esta região, apesar de *Sw-5*⁵ e *Sw-5*⁸ apresentarem uma deleção de 40 pares de bases. Nesta região foi possível identificar um provável sinal e dois possíveis sítios para poliadenilação (Figura 8).

*Sw-5*¹ 1 TGATGATAGCTAATTGTTGCAGCCACTCAAGTCTTGCTAGCCCATTTCTCTTTTGTGTAAT 62
*Sw-5*⁵ 1 **TGATGATAGCTAATTGTTGCAGCCACTCAAGTCTTGCTAGCCCATTTCTCTTTTGTGTA.. 62**
*Sw-5*⁷ 1 TGATGATAGCTAATTGTTGCAGCCACTCAAGTCT**GT**CTAGCCCATTTCTCTTT**GT**TGTAAT 62
*Sw-5*⁸ 1 TGATGATAGCTAATTGTTGCAGCCACTCAAGTCTTGCTAGCCCATTTCTCTTTTGTGTA.. 62
*Sw-5*⁹ 1 TGATGATAGCTAATTGTTGCAGCCACTCAAGT**G**TTGCTAGCCCATTTCTCTTTTGTGTAAT 62

*Sw-5*¹ 63 GTAATGTAACACAACACTACTATTTGCTACTTTTGTTCATTGATACACTCTTTTATGTATC 124
*Sw-5*⁵ 63 **TACACTCTTATTATGTATC 124**
*Sw-5*⁷ 63 GTAATGTAAC**CCA**ACTACTATTTGCTACTTT**GG**TTTTCAATTGATACACTCTTTTATGTATC 124
*Sw-5*⁸ 63 **TATACTCTTATTATGTATC 124**
*Sw-5*⁹ 63 GTAATGTAACACAACACTACTATTTGCTACTTTTGTTCATTGATACACTCTTTTATGTATC 124

*Sw-5*¹ 125 ATATGATTGGAGACAAA**TATAAA**TCAGTTGCT**TCATTCACTG**ATTTCTTCTT**GT**TATGCAGCT 187
*Sw-5*⁵ 125 **ATATGATTGGAGACAAA**TATAAA**ACAGTTACTCATTCACTG**ATTTCTTCTT**GT**TATGCAGCT 187
*Sw-5*⁷ 125 ATATGATTGGAGACAAA**TATAAA**TCAGTTGCT**TCATTCACTG**ATTTCTTCTT**GT**TATGCAGCT 187
*Sw-5*⁸ 125 ATATGATTGGAGACAAA**TATAAA**CCAGTT**ACTCATTCACTG**ATTTCTTCTT**GT**TATGCAGCT 187
*Sw-5*⁹ 125 ATATGATTGGAGACAAA**TATAAA**TCAGT**CGCTCATTCACTG**ATTTCT**CT**TGTATGCAGCT 187

*Sw-5*¹ 188 AGATTATACCTTTTGACCAATTTCTCTCCATTGAACATCTTCATATCTCAATACTCATCAAC 250
*Sw-5*⁵ 188 **AGATTATACCTTTTGACCAATTTCTCTCCATTGAACATCTTCACATCTCAATACACATTAAAC 250**
*Sw-5*⁷ 188 AGATTATACCTTTTGACCAATTTCTCTCCATTGAACATCTTCATATCTCAATAC**CATCAAC 250**
*Sw-5*⁸ 188 AGATTATACCTTTTGACCAATTTCTCTCCATTGAACATCTTC**CATCTCAATACATCAAC 250**
*Sw-5*⁹ 188 AGATTATACCTTTTGACCAATTTCTCTCCATTGAACATCTTCATATCTCAATACTCATCAAC 250

*Sw-5*¹ 251 CATGTTGTTGATTTTATAATTCGATCAACCATCCGAAAAATCTCAAGCTTAAATTTA 307
*Sw-5*⁵ 251 **CATGTTGTTGATTTTATAATTCGATCAACGATCCGAAAA****TTCTCAAGCTTAAATTC**A 307
*Sw-5*⁷ 251 CATGTTGTTGATTTTATAATTCGATCAATCGATCAAT**TCATCCGAAAAATCTCAAGCTTAAATTTA** 307
*Sw-5*⁸ 251 CATG**TCG**TTGATTTTATAATTCGATCAACCATCCGAAAAATCTCAAGCTTAAATTTA 307
*Sw-5*⁹ 251 CATGTTGTTGATTTTATAATTCGATCAAT**TCATCCGAAAAATCTCAAGCTTAAATTTA** 307

Figura 8 - Sequências de nucleotídeos correspondentes à região 3' não-traduzida de alelos do loco *Sw-5*. As modificações em relação ao alelo *Sw-5*¹ estão

destacadas em vermelho. Um provável sinal e dois possíveis sítios para poliadenilação estão destacados em negrito e sublinhados, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, 16 alelos do loco *Sw-5*, provenientes de vários genótipos de *Lycopersicon* spp., foram amplificados mediante PCR, clonados e caracterizados. A obtenção de vários alelos deste loco é de grande importância para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na diversificação e evolução dos genes de resistência, bem como para entender melhor o mecanismo molecular envolvido na especificidade da resistência. Do ponto de vista prático, a disponibilidade de vários alelos do loco *Sw-5* poderá resultar no desenvolvimento de uma cultivar que apresente uma resistência de espectro mais amplo e mais duradoura, uma vez que alelos com especificidades distintas podem ser combinados numa mesma cultivar, via transformação genética. Além disso, a combinação de regiões de diferentes alelos (quimeras) pode ser utilizada para construir *in vitro* novas especificidades de resistência, como já relatado para o gene *L* do linho (SIMONS *et al.*, 1998).

Dez alelos foram seqüenciados, sendo seis de maneira total e quatro de maneira parcial. Cinco dos seis alelos completamente seqüenciados codificam para ORF's potencialmente funcionais, uma vez que nenhum códon de terminação prematuro foi observado. A análise da seqüência revelou que os alelos do loco *Sw-5* codificam para proteínas variando entre 1240 e 1246 aminoácidos. Os alelos *Sw-5*³ e *Sw-5*¹⁰ codificam ORF's truncadas devido a um códon de terminação prematuro nas posições que correspondem aos aminoácidos 460 e 643 da ORF do gene *Sw-5*, respectivamente. O alelo *Sw-5*³

foi amplificado a partir do DNA de uma planta suscetível (PI 126944-13). O alelo *Sw-5*¹⁰ foi obtido de uma planta resistente, porém, nesse caso, foi identificado no mesmo produto de amplificação um outro alelo (*Sw-5*⁹) que codifica uma ORF completa.

Conforme mencionado, os alelos *Sw-5*⁹ e *Sw-5*¹⁰ são provenientes de um mesmo produto de amplificação, o qual foi gerado a partir do DNA da planta PI 126928-2. Situação semelhante foi observada com o produto de amplificação obtido da planta PI 126944-6, o qual originou os alelos *Sw-5*⁷ e *Sw-5*⁸. O alto grau de identidade de seqüência observada para os homólogos *Sw-5*⁷/*Sw-5*⁸ e *Sw*⁷/*Sw-5*¹⁰ sugere tratarem-se de alelos do mesmo loco. É possível que as plantas PI 126928-2 e PI 126944-6 sejam heterozigotas no loco *Sw-5*. Tal situação não seria surpreendente uma vez que *L. peruvianum* é uma espécie altamente polimórfica. É possível que mais de um alelo tenha sido amplificado nas demais amostras de DNA, mas não tenham sido identificados. Possíveis razões para isso incluem a análise de um número relativamente pequeno de clones (geralmente de quatro a oito clones por ligação) e o fato da caracterização digestão a enzima *EcoRI* não ter sido suficiente para revelar polimorfismo entre todos os alelos amplificados. Entretanto não se pode descartar a possibilidade das seqüências amplificadas serem provenientes de locos distintos, uma vez que homólogos do gene *Sw-5*¹ mapeiam em posições distintas no genoma do tomateiro (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000). Todavia, análises preliminares das seqüências destes cDNAs revelaram alta divergência em relação a *Sw-5*¹ na região amino terminal (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000; Brommonschenkel *et al.*, dados não-publicados).

Considerando-se a ORF completa, a identidade ao nível de aminoácidos dos alelos variou de 91,3 % a 96,6 %. Variações similares foram relatadas para os genes *Rps2* e *Rps4* que conferem resistência a *P. syringae* em *Arabidopsis* (CAICEDO *et al.*, 1999; GASSMANN *et al.*, 1999). Estes genes, que também estão na classe dos genes que codificam para proteínas com domínios NBS/LRR, encontram-se organizados no genoma como cópias únicas em um loco simples (ELLIS *et al.*, 2000b). Provavelmente, o loco *Sw-5* apresenta uma organização similar no genoma do tomateiro uma vez que o seqüenciamento de regiões que flanqueiam o loco não revelou nenhuma outra seqüência

homóloga a *Sw-5¹* (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000; Brommonschenkel *et al.*, dados não publicados). Nos casos dos genes *R* que fazem parte de locos complexos, as variações entre os membros do loco costumam ser maiores (PARKER *et al.*, 1997; BOTELLA *et al.*, 1998; ELLIS *et al.*, 1999; NOEL *et al.*, 1999; PARNISKE *et al.*, 1999).

Análises pareadas também foram realizadas considerando-se os domínios NBS, LRR e a extremidade amino, isoladamente. Como observado para outros genes *R* (PARKER *et al.*, 1997; BOTELLA *et al.*, 1998; NOEL *et al.*, 1999), o domínio NBS se apresentou como o mais conservado, com a identidade variando de 93,6 a 100 %, dependendo dos alelos comparados. A alta conservação do domínio NBS é esperada uma vez que esta região esta supostamente envolvida na ligação a nucleotídeos trifosfatados (TRAUT, 1994; BENT, 1996) e, portanto, sujeita a forte pressão de seleção.

A extremidade carboxi, região que compreende as LRR's das proteínas deduzidas, se apresentou mais variável que o domínio NBS. A identidade variou de 86,8 % a 96,8 %. Essa região tem sido apontada como a mais variável em muitas proteínas *R* (PARKER *et al.*, 1997; BOTELLA *et al.*, 1998; NOEL *et al.*, 1999; PARNISKE *et al.*, 1999; ELLIS *et al.*, 2000a). A menor conservação nas LRR's é atribuída ao fato de que esta região está supostamente envolvida no reconhecimento direto ou indireto da proteína elicitora do patógeno. Assim, para acompanhar a variabilidade do patógeno, novas especificidades de resistência têm que ser geradas. Muitas vezes as novas especificidades resultam de deleções ou substituições de aminoácidos nas LRR's assim como alterações no número das repetições (PARKER *et al.*, 1997; NOEL *et al.*, 1999; ELLIS *et al.*, 2000b).

Os domínios LRR's de todos os alelos são constituídos por aproximadamente 18 repetições. Cada repetição apresenta o consenso LxxLxLxx, onde "x" representa um aminoácido qualquer e o "L", leucina ou outro resíduo alifático. Estudos cristalográficos com a proteína porcina inibidora de ribonuclease revelaram que nas LRR's desta proteína os resíduos "L" hidrofóbicos estão voltados para o interior da molécula, enquanto os resíduos variáveis ("x") se voltam para o solvente, permitindo possivelmente a interação específica com o ligante (KOBÉ e DEISENHOFER, 1995). Estes fatos corroboram a maior variabilidade dos resíduos "x", em relação aos resíduos

alifáticos, observada para várias proteínas R (PARKER *et al.*, 1997; BOTELLA *et al.*, 1998; ELLIS *et al.*, 1999; NOEL *et al.*, 1999; PARNISKE *et al.*, 1999). Os dados obtidos nesse trabalho estão de acordo com esta observação, pois a maioria das variações dentro do consenso ocorreu nos resíduos “x”.

A região amino é a mais variável das proteínas codificadas pelos diferentes alelos. Esta variabilidade também sugere o envolvimento desta região na especificidade da resistência. A importância desta região na resistência já foi demonstrada em pelo menos um caso: os alelos *L6* e *L7* do linho que conferem resistência a duas raças de *Melampsora lini*, agente da ferrugem do linho, são idênticos nas regiões NBS e LRR, diferindo apenas em 11 resíduos de aminoácidos localizados na extremidade amino (SIMONS *et al.*, 1998; ELLIS *et al.*, 2000b). Todavia, ao contrário de *Sw-5*, o gene *L* apresenta na extremidade amino um domínio TIR e não um LZ.

A divergência de sequência também foi observada na região 3' não traduzida de quatro alelos analisados. Em organismos eucariotos esta região esta envolvida no processo de poliadenilação, que contribui para aumentar a estabilidade do mRNA (ALBERTS *et al.*, 1994). O oligonucleotídeo 19Pst anela nesta região. Uma vez que para a maioria das amostras onde este oligonucleotídeo foi empregado na PCR não se obteve produtos de amplificação, era possível que esta região fosse mais divergente que a região codificadora. Em dois alelos analisados (*Sw-5*⁵ e *Sw-5*⁸) foi observada uma deleção de 40 pares de bases nesta região. Porém, nem as mutações pontuais, nem as deleções comprometeram o provável sinal (TATAAA) ou os dois possíveis sítios para poliadenilação (TCATTCACT e TGTTATGCA). É possível que nos casos em que esta região não foi amplificada o sítio de anelamento do oligonucleotídeo 19Pst esteja deletado ou modificado a ponto de não permitir seu anelamento.

A diversificação de genes de resistência geralmente resulta da combinação de eventos como mutações pontuais, recombinação, inserção, deleção e duplicação (PRYOR e ELLIS, 1993; DANGL, 1995; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997; ROLAND, 1998; ELLIS *et al.*, 2000b). A comparação das seqüências do alelo *Sw-5*¹ e *Sw-5*² que conferem resistência e suscetibilidade a tospovírus, respectivamente, revelou que uma ou mais mutações pontuais pode(m) ser responsável(is) pela especificidade da

resistência. Apenas 54 substituições ao nível de aminoácidos foram observadas ao longo de toda a ORF. Dessas substituições 14 são não-sinônimas (levam a mudança de carga do aminoácido substituído). A grande maioria destas substituições se concentra na extremidade amino (sete) e nas LRR's (seis). A outra substituição não-sinônima se localiza no domínio NBS. Tais resultados indicam que essas regiões devem determinar a especificidade da resistência a tospovírus não somente no caso do alelo *Sw-5*¹, mas também para os alelos desse loco presente em outras espécies de *Lycopersicon* caracterizados neste trabalho. A análise funcional dos alelos clonados em plantas transgênicas, bem como o estudo de genes quiméricos combinando diferentes domínios dos entre os alelos *Sw-5*¹ e *Sw-5*², deverão fornecer subsídios para uma melhor compreensão das bases moleculares da resistência a tospovírus mediada por *Sw-5*¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, N.; METZ, M.; HOLUB, E.; STASKAWICZ, B.J.; DANIELS, M.J.; PARKER, J.E. Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *r* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.95, p.10306-10311, 1998.
- ADKINS, S.; QUADT, R.; CHOI, T.; AHLQUIST, P.; GERMAN, T. An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of tomato spotted wilt virus, a plant- and insect-infecting bunyavirus. **Virology**, v.207, p.308-311, 1995.
- ALBER, T. Structure of the leucine zipper. **Current Opinions in Genetics and Development**, v.2, p.205-210, 1992.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Molecular Biology of the Cell* 3^a. ed. Garland Publishing:New York, 1994. 1294p.
- ALFANO, J.R.; COLLMER, A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. **Plant Cell**, v.8, p.1683-1698, 1996.
- ARAMBURU, J.; RODRIGUEZ, M. Evaluation of commercial *Lycopersicon esculentum* hybrids for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in Spain. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.74, p.743-747, 1999.

- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v.276, p.726-733, 1997.
- BANDLA, M.D.; CAMPBELL, L.R.; ULLMAN, D.E.; SHERWOOD, J.L. Interaction of Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. **Phytopathology**, v.88, p.98-104, 1998.
- BELDA, J.E. Thrips (*F. occidentalis*)-TSWV. Deteción, evolución y situación actual en campo en Andalucía. **Consejería de Agricultura Ganadería y Pesca de Murcia**, p.41-46, 1992.
- BENT, A. F. Plant disease resistance: function meets structure. **Plant Cell**, v.8, p.1757-1771, 1996.
- BENT, A.F.; KUNKEL, B.N.; DAHLBECK, D.; BROWN, K.L.; ACHMIDT, R.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J.; STASKAWICZ, B.J. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine rich-repeat class of plant disease resistance genes. **Science**, v.265, p.1856-1860, 1994.
- BEZERRA, I.C.; RESENDE, R. O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; De ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, v.89, p.823-830, 1999.
- BOITEUX, L.S.; De ÁVILA, A.C. Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt *tospovirus* in *Capsicum chinense* PI 159236. **Euphytica**, v.75, p.139-142. 1994.
- BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, v.71, p.151-154, 1993.
- BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B.; ÁVILA, A.C.; SANTOS, J.R.M. 'TSW 10' Linhagem de tomate para mesa resistente a três espécies de tospovírus causadoras do Vira-cabeça. **Horticultura Brasileira**, v.11, p.163-164, 1993a.
- BOITEUX, L.S.; NAGATA, T.; GIORDANO, L.B.; Field resistance of tomato *Lycopersicon esculentum* lines to tomato spotted wilt disease. **TGC Reporter**, v.43, p.7-9, 1993b.
- BOTELLA, M.A.; PARKER, J.E.; FROST, L.N.; BITTNER-EDDY, P.D.; BEYNON, J.L.; DANIELS, M.J.; HOLUB, E.B.; JONES, J.D.J. Three genes of the *Arabidopsis RPP1* complex resistance locus recognize distinct

- Peronospora parasitica* avirulence determinants. **Plant Cell**, v.10, p.1847-1860, 1998.
- BRITTLEBANK, C.C. Tomato Diseases. **Journal of the Department of Agriculture in Victoria**. v.17, p.231-235, 1919.
- BROADBENT, A.B.; PREE, D.J. Resistance to insecticides in populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera:Thripidae) from greenhouses in the Niagara Region of Ontario. **The Canadian Entomologists** v.129, p.907-913, 1997.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; FRARY, A.; FRARY, A.; TANKSLEY, S.D. The Broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. **Molecular and Plant-Microbe Interaction**, v.13, p.1130-1138, 2000.
- BRYAN, G.T. *et al.* Molecular characterization of resistance/avirulence gene interactions in the rice blast system. In: Proceedings of the 9th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions: Biology of Plant-Microbe Interactions (vol.2) (De Wit, P.J.G.M. *et al.* eds.), p.35-39. St Paul, 2000.
- CAI, D.; KLEINE, M.; KIFLE, S.; HARLOFF, H.-J.; SANDAL, N.N.; MARCKER, K.A. *et al.* Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. **Science**, v.275, p.832-834, 1997.
- CAICEDO, A.L.; SCHAAL, B.A.; KUNKEL, B.N. Diversity and molecular evolution of the *RPS2* resistance gene in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of the Science of USA**, v.96, p.302-306, 1998
- CHO, J.J.; CUSTER, D.M.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; TANKSLEY, S.D. Conventional breeding: host-plant resistance and use of molecular markers to development resistance to tomato spotted wilt virus in vegetables. **Acta Horticulturae**, v.431, p.367-378, 1996.
- COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; LOURENÇO, A.L.; MELO, A.M.T.; SIQUEIRA, W.J. Detecção do *Chrysanthemum stem necrosis virus* em tomateiro no estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, v.26, p.252-254, 2000.
- CORTÊS, I.; LIVIERATOS, I.C.; DERKS, A.; PETERS, D.; KORMELINK, R. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. **Phytopathology**, v.88, p.1276-1282, 1998.
- CRUTE, I.R.; PINK, D.A C. Genetics and utilization of pathogen resistance. **Plant Cell** v.8, p.1747-1755, 1996.
- DANGL, J.L. Pièce de Résistance: Novel classes of plant disease resistance genes. **Cell**, v.80, p.363-366, 1995.

- DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M.H. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. **Plant Cell**, v.8, p.1757-1171, 1996.
- De ÁVILA, A.C. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. **Horticultura Brasileira**, v.11, p.179-183, 1993.
- De ÁVILA, A.C.; DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R. O.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Classification of tospoviruses based on the phylogeny of nucleocapsid gene sequences. **Journal of General Virology**, v.74, p.153-159, 1993a.
- De ÁVILA, A.C.; DE HAAN, P.; SMEETS, M.L.L.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, E.W.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. **Archives of Virology**, v.128, p.211-227, 1993b.
- De ÁVILA, A.C.; HUGUENOT, C.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, E.W.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. **Journal General of Virology**, v.71, p.2801-2807, 1990.
- De HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.O.; VAN POELWIJK, F.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polimerase. **Journal of General Virology**, v.71, p.2207-2216, 1991.
- De HAAN, P.; WAGEMAKERS, L.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. **Journal of General Virology**, v. 71, p.1001-1007, 1990.
- DÍEZ, M'J.; ROSELLÓ, S.; JORDÁ, C.; LACASA, A.; COSTA, J.; NUEZ, F. Agronomic behavior of resistant tomato cultivars and lines to TSWV and influence of inoculation methods. **Acta Horticulture**, v.402, p.527-532, 1995.
- DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.479-501, 1994.
- ELLIS, J.; LAWRENCE, G.J.; LUCK, J.E.; DODDS, P. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine difference in gene-for-gene specificity. **Plant Cell**, v.11, p.495-506, 1999.

- ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. The generation of plant resistance gene specificities. **Trends in Plant Science**, v.5, p.373-379, 2000a.
- ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current Opinions in Plant Biology**, v.3, p.278-284, 2000b.
- FAJARDO, T.V.M.; LOPES, C.A.; SILVA, W.L.C., DE ÁVILA, A.C. Dispersão da doença e redução da produção em tomateiro infectado por tospovírus no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.413-418, 1997.
- FALK, A.; FEYES, B.; FROST, L.N.; JONES J.D.G.; DANIELS, M.J.; PARKER, J.E. *EDS1* an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukariotic lipases. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v.96, p.3292-3297, 1999.
- FINLAY, K.W. Inheritance of spotted wilt resistance in tomato II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. **Australian Journal Biology Science**, v.6, p.153-163, 1953.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.
- FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses. **Archives of Virology**, v.2, p.1-450, 1991.
- FULTON, T.M., CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.13, p.207-209, 1995.
- GABRIEL, D.; ROLFE, B. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.365-391, 1990.
- GARCIA, L.E.; BRANDENBURG, R.L.; BAILAEY, J.E. Incidence of tomato spotted wilt tospovirus (*Bunyaviridae*) and Tobacco rhrrips in Virginia-types peanuts in North Carolina. **Plant Disease**, v.84, p.459-464, 2000.

- GASSMANN, W.; HINSCH, M.E.; STASKAWICZ, B.J. The *Arabidopsis* *RPS4* bacterial-resistance gene is an member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. **Plant Journal**, v.20, p.265-277, 1999.
- GERMAN, T.L.; ULLMAN, D.E.; MOYER, J.W. *Tospoviruses*: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.315-348, 1992.
- GIELEN, J.J.L.; DE HAAN, P.; KOOL, A.J.; PETERS, D.; VAN GRINTEN, M.Q.J.M.; GOLDBACH, R. Engineered resistance to tomato spotted wilt virus. **Bio/Technology**, v.9, p.1363-1367, 1991.
- GOLDBACH, R.; PETERS, D. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. **Seminars in virology**, v.5, p. 113-120, 1994.
- GOPALAN, S.; BAUER, D.W.; ALFANO, J.R.; LONIELLO, A.O.; HE, S.Y.; COLLMER, A. Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plants cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. **Plant Cell**, v.8, p.1095-1105, 1996.
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.
- HEINZE, C.; MAISS, E.; ADAM, G.; CASPER, R. The complete nucleotide sequence of the S RNA of a new *Tospovirus* species, representing serogroup IV. **Phytopathology**, v.85, p.683-690, 1995.
- HOFFMANN, K.; QIU, W.P.; MOYER, J.W. Overcoming host- and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of tomato spotted wilt virus. **Molecular and Plant-Pathogen interaction**, v.14, p.242-249, 2001.
- HOLMES, F.O. Resistance to spotted wilt in tomato. **Phytopathology**, v.38, p.467-473. 1948.
- IIZUKA, N.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B.; NAGATA, T.; DUSI, A.N. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in wild *Lycopersicon* species. **Tomato Genetics of Cooperative Reports**, v.43, p.20-22, 1993.
- JAHN, M.; PARAN, I.; HOFFMANN, R.; RADWANSKI, E.R.; LEVINGSTONE, K.D.; GRUBE, R.C.; AFTERGOOT, E.; LAPIDOT, M.; MOYER, J. Genetic mapping of the *Tsw* locus for resistance to the *Tospovirus* *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum* spp. and its relationship to the *Sw-5* gene for

- resistance to the same pathogen in tomato. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.13, p.673-682, 2000.
- JAIN, R.K.; PAPPU, H.R.; PAPPU, S.S.; KRISHNA REDDY, M.; VANI, A. Watermelon bud necrosis tospovirus is a distinct virus species belonging to a serogroup IV. **Archives of Virology**, v.143, p.1637-1644, 1998.
- JONES, A.M.; DANGL, J.L. Logjam at the styx: programmed cell dead in plants. **Trends in plant science**, v.1, p.114-119, 1996.
- KAMOUN, S.; VAN WEST, P.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; DE GROOT, K., GOVERS, F. Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by recognition of the protein elicitor INF1. **Plant Cell**, v.10, p.1413-1425, 1998.
- KAMOUN, S.; HONEÉ, G.; WEIDE, R.; LAUGÉ, R.; KOOMAN-GERSMANN, M.; DE GROOT, K.; GOVERS, F.; DE WIT, P.G.M. The fungal gene *avr9* and oomycete gene *inf1* confer avirulence to potato virus X on tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.459-462, 1999.
- KATO, K.; HANADA, K.; KAMEYA-IWAKI, M.; *Melon yellow spot virus*: a distinct species of the genus *Tospovirus* isolated from melon. **Phytopathology**, v.90, p. 422-426, 2000.
- KEARNEY, B.; STASKAWICS, B.J. Widespread distribution and fitness of *Xanthomonas campestris* avirulence genes *avrBs2*. **Nature**, v.346, p.385-386, 1990.
- KIKKERT, M.; MEURS, C.; VAN DE WETERING, F.; DORFMÜLLER, S.; PETERS, D.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. Binding of tomato spotted wilt virus to a 94 kDa thrips protein. **Phytopathology**, v.88, p.63-69, 1998.
- KIKKERT, M.; VAN POELWIJK, F.; STORMS, M.; KASSIES, W.; BLOKSMA, VAN LENT, J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. **Journal of General Virology**, v.78, p.1755-1763, 1997.
- KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O.; De ÁVILA, A.C.GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Immuno-electron microscopical detection of tomato spotted wilt virus and its nucleocapsids in crud plant extracts. **Journal Virological Methods**, v.38, p.313-322, 1992.
- KOBE, B.; DEISENHOFER, J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. **Nature**, v.374, p.183-186.
- KORMELINK, R.; KITAJIMA, E.W.; DE HANN, P.; ZUIDEMA, D.; PETERS, D., GOLDBACH, R. The nonstructural protein (NSs) encoded by ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. **Virology**, v.181, p.459-468, 1991.

- KORMELINK, R.; DE HAAN, P.; MEURS, C.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **Journal of General Virology**, v.73, p.2795-2804, 1992a.
- KORMELINK, R.; DE HAAN, P.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Viral synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants. **Journal of General Virology**, v.73, p.687-693. 1992b.
- KORMELINK, R., VAN POELWIJK, F., PETERS, D., GOLDBACH, R. Non viral heterogenous sequences of the 5' ends of tomato spotted wilt virus MRNAs. **Journal of General Virology**, v.73, p.2125-2128. 1992c.
- KUMAR, N.; IRULAPPAN, I. Inheritance to spotted wilt virus in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal of Genetics and Breeding**, v.46, p.113-118, 1992.
- KUMAR, N.K.; ULLMAN, D.E. Evaluation of *Lycopersicon* germoplasm for tomato spotted wilt tospovirus resistance by mechanical inoculation and thrips transmission. **Plant Disease**, v.77, p.938-941, 1993.
- LATHAM, L.J.; JONES, R.A.C. Selection of resistance breaking strains of tomato spotted wilt tospovirus. **Annals of Applied Biology**, v.133, p.385-402, 1998.
- LAU, D. Análise de fatores que influenciam a resistência a Tospovírus conferida pelo gene Sw-5 em tomateiro e tabaco. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa. 2000. 82p.
- LAU, D.; CARVALHO, E.C.S.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; LIMA, G.S.A.; ZERBINI, F.M. Analysis of the Sw-5-mediated response to *Tospovirus* species. **Virus Reviews & Research** v.4, p.154-155, 1999.
- LAW, M.D.; SPECK, J.; MOYER, J.W. The M RNA of impatiens necrotic spot *Tospovirus* (Bunyaviridae) has na ambisense genomic organization. **Virology**, v.188, p.732-741. 1992.
- LAWRENCE, G.J.; FINNEGAN, E.J.; AYLLIFE, M.A.; ELLIS, J.G. The L6 gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. **Plant Cell**, v.7, p.1195-1206, 1995.
- LAWSON, R.H.; DIENELT, M.M.; HSU, H.T. Cytopathology of Tospovirus-Host-Plant Interactions. **Acta Horticulturae**, v.431, p.267-290. 1996.
- LEACH, J.E.; WHITE, F.F. Bacterial avirulence genes. **Annual Review of Phytopathology** v.34. p.153-179, 1996.

- LIMA, G.S.A.; PICOLI, E.A.T.; LAU, D.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Signal transduction pathways mediated by *Sw-5* gene are conserved in eggplant. **Virus Review & Research**, v.5, p.191-192, 2000.
- LIMA, M.F.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O.; NAGATA, T. Levantamento e identificação de espécies de tospovírus em tomateiro e pimentão no Submédio do Vale do São Francisco e no Distrito Federal. **Summa Phytopatologica**, v.26, p.205-210, 2000.
- LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 67p.
- MALUF, W.R.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D. Fontes de resistência ao vírus do vira cabeça do tomateiro no gênero *Lycopersicon*. **Fitopatologia Brasileira**, v.7 (suplemento), p.62, 1989.
- MARTIN, G.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M.W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v.262, p.1432-1436, 1993.
- MARTIN, G.B.; FRARY, A.; WU, T.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; EARLE, E.; TANKSLEY, S.D. A member of tomato *Pto* gene family confers sensitivity to fenthion resulting in rapid cell death. **Plant Cell**, v.6, p.1534-1552, 1993.
- MEDEIROS, R.B.; GERMAN, T.L. Identification of a plant virus putative receptor in the insect vector cells. **Virus Review & Research**, v.5, p.191, 2000.
- MEDEIROS, R.B.; ULMAN, D.; SHERWOOD, J.L.; GERMAN, T.L. Immunoprecipitation of a 50-kDa protein: a candidate receptor component for tomato spotted wilt tospovirus (*Bunyaviridae*) in its main vector, *Frankliniella occidentalis*. **Virus Research**, v.67, p.109-118, 2000.
- MEYERS, B.C.; SHEN, K.A.; ROHANI, P.; GAUT, B.S.; MICHELMORE, R.W. Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. **Plant Cell**, v.11, p.1833-1846, 1998.
- MILNE, R.G.; FRANCKI, R.I.B. Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae? **Intervirology**, v.22, p.72-76, 1984.
- MORISATO, D.; ANDERSON, K.V. The signaling pathways that establish dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. **Annual Review of Genetics**, v.29, 371-399, 1995.
- MOUND, L.A. The thysanoptera vector species of tospoviruses. **Acta Horticulturae**, v.431, p.298-309. 1996.

- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. **Archives of Virology**, v.10, p.300-315, 1995.
- NAGAI, H.; LOURENÇÃO, A.L.; SIQUEIRA, W.J. Comportamento de linhagens de tomate derivadas de *Lycopersicon peruvianum* e *L. hirsutum* ao vírus de vira-cabeça. **Horticultura Brasileira**, v.7, p.67, 1989.
- NAGATA, T.; DE ÁVILA, A.C.; TAVARES, P.C.M.; BARBOSA, C.J.; JULIATTI, F.C.; KITAJIMA, E. W. Occurrence of different tospoviruses species in six states of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.90-95, 1995.
- NAGATA, T.; GOLDBACH, R.; PATERS, D. Towards the establishment of a semi-continuous cell line of thrips and application of primary cell culture to study tomato spotted wilt virus replication. **Invertebrate Cell Culture**, v., p.25-31, 1997.
- NOEL, L.; MOORES, T.L.; VAN DER BIEZEN, E.A.; PARNISKE, M.; DANIELS, M.J.; JONES, J.E. Pronounced intraspecific haplotype divergence at the *RPP5* complex disease resistance locus of Arabidopsis. **Plant Cell**, v.11, p.2099-2112, 1999.
- PALIWAL, Y.C. Some properties and thrips transmission of tomato spotted wilt virus in Canada. **Canadian Journal of Botany**, v.52, p.1177-1182, 1974.
- PARKER, J.E.; COLEMAN, M.J.; SZABO, V.; FROST, L.N.; SCHIMIDT, R.; VAN DER BIEZEN, E.A.; MOORES, T.L.; DEAN, C.; DANIELS, M.J.; JONES, J.D.G. The Arabidopsis downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. **Plant Cell**, v.9, p.879-894, 1997.
- PARNISKE, M.; WULFF, B.B.H.; BONNEMA, G.; THOMAS, C.M.; JONES, D.A.; JONES, J.D.G. Homologous of the *Cf-9* disease resistance gene (*Hcr9s*) are present at multiple loci on the short arm of tomato chromosome 1. **Molecular and Plant-Pathogen Interaction**, v.12, p. 93-102, 1999.
- PATERSON, R.G.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Resistance in two *Lycopersicon* species to a Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. **Euphytica**, v.43, p.173-178, 1989.
- PAVAN, M.A.; COSTA, A.S.; KUROZAWA, C.; SOLER, J.M.P. Infecção localizada em frutos de tomateiro causada por tospovírus. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.14-19, 1996.
- PETERS, D.; DE ÁVILA, A.C.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE, R.O.; DE HANN, P.; GOLDBACH, R. A overview of tomato spotted wilt virus. In: Hsu, H.T.;

- Lawson, R.H. (Eds.) Virus-thrips-plant interactions of TSWV. Proceedings USDA Workshop, Beltsville, USA. p.1-14, 1991.
- PICOLI, E.A.T.; LIMA, G.S.A.; LAU, D.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Heterologous expression of the *Sw-5* gene in eggplant (*Solanum melongena*) confers resistance to *Tospovirus* infection. **Virus Reviews & Research**, v.4, p. 155, 1999.
- PONTIER, D.; BALAGUÉ, C.; ROBY, D. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. **Life Science**, v.321, p.721-734, 1998.
- POZZER, L.; RESENDE, R. O.; LIMA, M.F.; KITAJIMA, E.; GIORDANO, L. B.; De ÁVILA, A.C. Tospovirus: uma visão atualizada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.95-148, 1996.
- POZZER, L.; BEZERRA, I.C.; KORMELINK, R.; PRINS, M.; PETERS, D.; RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C.. Characterization of a distinct tospovirus isolate of iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. **Plant Disease**, v.83, p.345-350, 1999.
- PRYOR, T.; ELLIS, J. The gene complexity of fungal resistance genes in plants. **Advances in Plant Pathology**, v.10, p.281-305, 1993.
- RESENDE, R. O.; De HAAN, P.; De ÁVILA, A. C.; KITAJIMA, E.W.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2375-2383, 1991.
- RESENDE, R.O. Diversidade de tospovírus no mundo. Informações resumidas sobre o "International Symposium of Tospoviruses and Thrips of Floral e Vegetable Crops". **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.656-657, 1995.
- RICK, C.M. Biosystematics studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. p.667-678. In: Hawkes, J.G.; Nester, R.N.; Skelding (Eds.) The biology and Taxonomy of the Solanaceae. Academic Press, New York. 1979.
- ROLAND, P.C. Resistance genes evolution. **Current Opinion in Biology**, v.1, p.294-298, 1998.
- ROSELLÓ, S.; DIEZ, M. J.; NUEZ, F. Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.499-509, 1998.
- ROSELLÓ, S.; DIEZ, M.J.; LACASA, A.; JORDÁ,C.; NUEZ, F. Testing resistance to TSWV introgressed from *Lycopersicon peruvianum* by artificial transmission techniques **Euphytica**, v.67, p.93-98, 1997.

- ROSELLÓ, S.; DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop.I. The tomato spotted wilt virus – a review. **Scientia Horticulturae**, v.67, p.117-150, 1996.
- ROSELLÓ, S.; SOLER, M.; DIEZ, M. J.; RAMBLA, J.L.; RICHARTE, C.; NUEZ, F. New sources for high resistance of tomato to tomato spotted wilt virus from *Lycopersicon peruvianum*. **Plant Breeding**, v.118, p.425-429, 1999.
- SAKIMURA, K. *Frankliniella fusca*, an additional vector of tomato spotted wilt virus, with notes on *Thrips tabacci*, another vector. **Phytopathology**, v.53, p.412-415, 1962.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SAMUEL, G.; BALD, J.G.; PITTMAN, H.A. Investigation on spotted wilt of tomatoes. **Australian Council Science Industry Research Bulletin**, v.44, p.64, 1930.
- SATYANARAYANA, T.; GOWDA, S.; REDDY, K.L.; MITCHELL, S.E.; DAWSON, W.O.; REDDY, D.V.R. Peanut yellow spot virus is a member of a new serogroup of the *Tospovirus* genus based on small (S) RNA sequence and organization. **Archives of Virology**, v.143, p.353-364, 1998.
- SATYANARAYANA, T.; MITCHELL, S.E.; REDDY, D.V.R.; KRESOVICH, S.; JARRET, R.; NAIDU, R.A.; GOWDA, S.; DEMSKI, J.W. Peanut bud necrosis tospovirus S RNA: complete nucleotide sequence, genome organization and homology to other tospoviruses. **Archives of Virology**, v.141, p.85-98, 1996.
- SIMONS, G.; GROENENDIJK, J.; WIJBRANDI, J.; REIJANS, M.; GROENEN, J.; DIERGAARDE, P. *et al.* Dissection of the *Fusarium* *l2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. **Plant Cell**, v.10, p.1055-1068, 1998.
- STAHL, E.A.; BISHOP, J.G. Plant-pathogen arms races at the molecular level. **Current Opinions in Biology**, v.3, p.299-304, 1998.
- STEVENS, M.R.; CANADY, M.; BARINEAU, M. What we know about tospovirus resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) derived from the wild specie *L. chilense*. In: PETERS, D.; GOLDBACH, R. **Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research**, v.4, p.19-20, 1998.
- 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.

- STEVENS, P.G. Tomato Breeding. Project Repot W-Vv1. Dept. Agricultural Technical Services. Republic of South Africa, 1964.
- STEVENS, M.R.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Evaluation of seven *Lycopersicon* species for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV). **Euphytica**, v.80, p.79-84, 1994.
- STORMS, M.M.H.; KORMELINK, R.; PETERS, D.; VAN LENT, J.W.M.; GOLDBACH, R. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. **Virology**, v.214, p.485-493. 1995.
- SWARUP, S.; YANG, Y. N.; KINGSLEY, M. T.; GABRIEL, D. H. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v.5, p.204-209, 1992.
- TAKASHINA, T.; IMANISHI, S.; EGASHIRA, H. Evaluation of the cross-incompatibility of 'peruvianum-complex' lines with *Lycopersicon esculentum* Mill. by the ovule selection method. **Breeding Science**, v.42, p.33-37, 1997.
- TANG, X.; FREDERICK, R.D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D.A.; JIA, Y.; MARTIN, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. **Science**, v.274, p.2060-2063, 1996.
- THOMAS, C.M.; JONES, D.A.; PARNISKE, M.; HARRISON, K.; BALINT-KURTI, D.J.; HATZIXANTHIS, K.; JONES, J.D. Characterization of tomato *Cf-4* for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* e *Cf-9*. **Plant Cell**, v.9, p.2209-2224, 1997.
- THOMPSON, G.J.; VAN ZIJL, J.J.B. Control of Tomato Spotted Wilt Virus in Tomatoes in South Africa. **Acta Horticulture**, v.432, p.379-384, 1996.
- TRAUT, T.W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. **European Journal of Biochemistry**, v.222, p.9-19, 1994.
- ULLMAN, D.E.; CHO, J.J.; MAU, R.F.L.; WESTCOT, D.M.; CUSTER, D.M. A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flowerthrips. **Phytopathology**, v.82, p.1333-1342. 1992.
- ULLMAN, D.E.; DAPHANE, M.W.; CHENAULT, K.D.; SHERWOOD, J.L.; GERMAN, T.L.; BANDLA, M.D.; CANTONE, F.A.; DUER, H.L. Compartmentalization, intracellular transport, and autophagy of tomato

- spotted wilt virus proteins in infected thrips cells. **Phytopathology**, v.85, p.644-654. 1995.
- ULLMAN, D.E.; GERMAN, T.L.; SHERWOOD, J.L.; WESTCOT, D.M.; CANTONE, F.A. *Tospovirus* replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by S RNA of tomato spotted wilt virus is present in thrips vector cells. **Phytopathology**, v.83, p.456-463. 1993.
- VAN GIJSEGEN, F.; GENIN, S.; BOUCHER, C. *hrp* and *avr* genes, key determinants controlling the interactions between plants and gram-negative bacteria. **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histochemical, biochemical, genetic and molecular bases**. Vol I - Prokaryotes. Londres, Pergamon, 1995. p. 273-292.
- VAN POELWIJK, F.; De HAAN, P.; KIKKERT, M.; PRINS, M.; KORMELINK, R.; STORMS, M.; VAN LENT, JAN.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Replication and expression of tospoviral genome. **Acta Horticulturae**, v.431, p.201-208, 1996.
- VAN POELWIJK, F.; KIKKERT, M.; PRINS, M.; KORMELINK, R.; STORMS, M.; VAN LENT, JAN.; PETERS, D.; GOLDBACH, R.; DE HAAN, P. Replication and expression of tospoviral genome. In: International Symposium on Tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops. Taiwan, p. 22, 1995.
- WARREN, R.F.; HENK, A.; MOWERY, P.; HOLUB, E.; INNES, R.W. A mutation within the leucine-rich repeat domain of the Arabidopsis disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. **Plant Cell**, v.10, p.1439-1452, 1998.
- WATTERSON, J.; WYATT, CC.; CHO, J.J.; CUSTER, D.O. Inheritance of tomato spotted wilt resistance in tomato. International Society of Horticultural Science Vegetable virus Working Group. 6th Conference: Recent Advances in Vegetable Virus Research, 1989.
- WHITHAM, S.; DINESH-KUMAR, S.P.; CHOI, D.; HEHL, R.; CORR, C.; BAKER, B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor. **Cell**, v.78, p.1101-1115, 1994.
- WIJKAMP, I.; ALMARZA, N.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, v.85, p.1069-1074, 1995.

- WIJKAMP, I.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Propagation of tomato spotted wilt virus in *Frankliniella occidentalis* does neither result in pathological effects nor in transovarial passage of the virus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.81, p.285-292. 1996.
- WIJKAMP, I.; VAN LENT, J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. **Journal of General Virology**, v.74, p.341-349. 1993.
- YEH, S.D.; CHANG, T.F. Nucleotide sequence of the N gene of the watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. **Phytopathology**, v.85, p.58-64, 1995.
- YONG, N.D. The genetic architecture of resistance. **Current Opinions in Plant Biology**, v.3, p.285-290, 2000.
- YU, I-C.; PARKER, J.; BENT, A.F. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v.93, p.7819-7824, 1998.