

EDGAR PAULINO DE SOUSA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE HOMÓLOGOS
DO GENE *Sw-5* AMPLIFICADOS DO ACESSO LA 371
DE *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill.**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005**

DEDICAÇÃO

Dedico esta tese à minha querida mãe Geralda, aos meus irmãos Cláudio, José Carlos e Valdir, à minha irmã Nilda e a minha querida esposa Fanny.

Ofereço a todos meus verdadeiros amigos, em especial ao amigo Lúcio Mauro S. Guimarães.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dar força e luz em todos os momentos da minha vida.

À minha querida mãe Geralda pelo apoio, carinho e força tornando tudo isso possível.

Aos meus irmãos (ã), cunhadas (o) e sobrinhas (o) pelo apoio dado e pela presença constante em minha vida.

À minha esposa Fanny pelo apoio, amizade, força e amor em todos os momentos.

A D^a Sônia pela amizade, apoio e carinho maternal.

A CAPES por ter concedido auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) em especial ao Departamento de Fitopatologia por ter me dado a oportunidade e o suporte para o desenvolvimento desta tese.

Ao Professor Sérgio H. Brommonschenkel pela orientação, pela confiança e pelo suporte laboratorial necessário para o desenvolvimento desta tese.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos, em especial os professores Acelino Couto Alfenas e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti pela amizade, confiança e apoio durante os cursos de graduação e pós-graduação.

Aos professores Francisco Murilo Zerbini Júnior, Derly J. H. Da Silva, Fabrício de Ávila Rodrigues e ao Dr. Douglas Lau pelas sugestões e correções desta tese.

Aos meus verdadeiros mestres e amigos Dr. Luiz Artur, Dr. Miguel Angel e Dr. Douglas Lau pelos ensinamentos e amizade.

Ao Professor Wagner Campos Otoni pela amizade, confiança e ensinamentos.

Ao amigo Danival Vieira de Freitas pela amizade construída nesses anos.

Aos amigos de república Rogério, Lauro, Luciano e Eugênio pela amizade, paciência e união.

Aos amigos Batista e Tomé pela amizade, apoio e caronas de Rio Pomba a Viçosa.

Aos amigos Lúcio M. S. Guimarães e Miki pela amizade, apoio e aprendizado no desenvolvimento desta tese.

À amiga Cynthia pela amizade e apoio durante o curso de mestrado.

A todos amigos do Laboratório de Genômica em especial Gustavo e Bruno pela amizade e ajuda nesses anos de convivência.

Aos funcionários e amigos Luís Carlos e Tadeu pela amizade, boa vontade e prestabilidade demonstradas.

Aos funcionários e amigos da cozinha José Fausto, Gláucia e Marlene pela amizade, boa vontade e prestabilidade demonstradas.

A todos amigos dos Laboratórios de Patologia Florestal, Cultura de Tecidos e Virologia Vegetal, em especial Márcia Brandão.

A todos aos meus verdadeiros amigos.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Material vegetal	5
2.2 Clonagem e caracterização das seqüências amplificadas	5
2.3 Caracterização das seqüências clonadas com base na análise de restrição da região 5'	7
2.4 Seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes	8
2.5 Modificação do sítio múltiplo de clonagem do vetor binário pBI121	11
2.6 Transferência das seqüências clonadas para o vetor binário pBI121	11
3. RESULTADOS	13
3.1 Clonagem e caracterização molecular dos homólogos do gene <i>Sw-5</i>	13
3.2 Seqüenciamento dos homólogos do gene <i>Sw-5</i>	16
3.3 Transferência das seqüências homólogas para o vetor binário pBI121 ..	24
4. DISCUSSÃO	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMO

SOUSA, Edgar Paulino de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2005. **Clonagem e caracterização de homólogos do gene Sw-5 amplificados do acesso LA 371 de *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

O gene Sw-5, membro de uma família multigênica com membros dispersos nos cromossomos 9 e 12 do tomateiro, é o principal gene de resistência a tospovírus utilizado nos programas de melhoramento de tomateiro para a indústria e para mesa. O acesso LA 371 de *Lycopersicon peruvianum* possui resistência de amplo espectro a tospovírus e estudos de introgressão e análise genética da resistência demonstraram que a resistência desse acesso é determinada por um gene dominante localizado no loco Sw-5 ou em um loco proximalmente ligado. Estudos prévios haviam levantado a hipótese de que oligonucleotídeos que anelam nas regiões correspondentes ao início da ORF codificada por Sw-5 e na região 5' deste gene poderiam amplificar seqüências do loco Sw-5 e de um loco proximalmente ligado. Esta hipótese foi confirmada neste trabalho. Utilizando esses oligonucleotídeos foram amplificados e clonados dois genes homólogos ao Sw-5, denominados de homólogo 1 e homólogo 2, a partir de DNA extraído de uma planta resistente a tospovírus denominada EP-1 derivada do acesso LA 371. As proteínas putativas codificadas por esses homólogos apresentam 92,94 % de similaridade diferindo em 82 aminoácidos. A proteína 2 é mais similar à proteína codificada pelo gene Sw-5 (99,28%) sugerindo que o homólogo 2 é responsável pela resistência a tospovírus encontrada em LA 371. Essas seqüências foram transferidas para o vetor binário pBI121 e experimentos de transformação encontram-se em andamento visando à comprovação da função desses homólogos na resistência de LA 371 a tospovírus.

ABSTRACT

SOUSA, Edgar Paulino de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April of 2005. **Cloning and characterization of Sw-5 homologous sequences amplified from *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill accession LA 371.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

The gene *Sw-5*, member of a multigenic family with members dispersed in tomato chromosomes 9 and 12, is the most used tospovirus resistance gene in tomato breeding programs. The *Lycopersicon peruvianum* accession LA 371 has a broad-spectrum tospovirus resistance. Genetic analysis has demonstrated that a dominant gene located in the *Sw-5* locus or in a closely linked locus is responsible for tospovirus resistance of this accession. Prior studies suggested that oligonucleotides with complementary sequences corresponding to the terminal regions of the *Sw-5* ORF would be able to amplify sequences from the *Sw-5* locus and from one closely linked locus. This hypothesis was confirmed in this work. DNA extracted from a tospovirus resistant plant called EP-1, derived from the accession LA 371, was used as template for PCR amplification. The PCR product was cloned and restriction analysis revealed that two *Sw-5* homologous sequences, called homologous 1 and homologous 2, had been cloned. The putative protein codified by these homologous display 92.94% of similarity for each other, differing in 82 amino acids. The protein coded by homologous 2 is more similar to *Sw-5* protein (99.28%) suggesting that this homologous is responsible for the LA 371 tospovirus resistance. These sequences were transferred to the binary vector pBI121 and transformation experiments are in progress aiming to test this hypothesis.

1. INTRODUÇÃO

Os tospovírus estão entre os vírus de maior importância para a agricultura mundial, provocando perdas significativas na produção de várias culturas, principalmente em hortaliças (POZZER *et al.*, 1996; FAJARDO *et al.*, 1997). Esses vírus pertencentes à família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*, causam em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) a doença conhecida como “vira-cabeça” (GERMAN *et al.*, 1992). Das treze espécies conhecidas de tospovírus, pelo menos quatro já foram relatadas infectando naturalmente o tomateiro no Brasil: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (POZZER *et al.*, 1996) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (COLARICCIO *et al.*, 2000).

O principal método de controle do “vira-cabeça” tem sido o uso de cultivares resistentes. O gene *Sw-5* é o principal gene de resistência a tospovírus utilizado em programas de melhoramento de tomateiro para a indústria e para mesa (CHO *et al.* 1996; ROSELLÓ *et al.*, 1998). Esse gene é originário de uma espécie silvestre do tomateiro [*L. peruvianum* (L.) Mill] e foi introgridido na cultivar Stevens (*L. esculentum*) (STEVENS *et al.*, 1992). O gene *Sw-5* confere resistência efetiva contra isolados de TSWV (STEVENS *et al.*, 1992), TCSV, GRSV (BOITEUX e GIORDANO, 1993) e CSNV (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 1998).

O gene *Sw-5* é membro de uma família multigênica com membros dispersos nos cromossomos 9 e 12 do tomateiro (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000). Análise de sua expressão gênica indicou a presença de transcritos de tamanhos similares em variedades resistentes e suscetíveis, sugerindo que a diferença quanto à resistência a tospovírus nestes materiais, possivelmente, não está relacionada a variações na expressão do gene, mas sim a diferenças estruturais nas proteínas codificadas pelos diferentes alelos do loco *Sw-5*

(BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000). O gene *Sw-5* codifica uma proteína de 1246 aminoácidos cuja estrutura é similar a de outras proteínas envolvidas na resistência de plantas a doenças, incluindo as proteínas Mi, Prf, I2 e HERO do tomateiro que conferem resistência a *Meloidogyne* spp. (MILLIGAN *et al.*, 1998) e ao inseto *Macrosiphum euphorbiae* (ROSSI *et al.*, 1998, VOS *et al.*, 1998), a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (SALMERON *et al.*, 1996), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (ORI *et al.*, 1997) e a *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* (ERNST *et al.*, 2002), respectivamente, e RPM1 de *Arabidopsis*, que confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (GRANT *et al.*, 1995; BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000; TORNERO *et al.*, 2002). Em comum, são proteínas citoplasmáticas, que apresentam domínios que contêm repetições ricas em aminoácido leucina (LRR's, "leucine rich repeats"), sítios de ligação a nucleotídeos trifosfatados (NBS, "nucleotide binding site") e na região N-terminal um zíper de leucina (LZ, "leucine-zipper") ou um domínio "coiled-coil" (DANGL e JONES, 2001; MARTIN *et al.*, 2003). Os domínios LRR atuam em interações proteína-proteína (KOBÉ e KAJAVA, 2001), o que sugere que a proteína *Sw-5* pode se ligar diretamente ao produto do gene 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 (HR) e a outras respostas de defesa. Os domínios NBS têm sido relatados em várias proteínas que atuam como sinalizadores celulares (ELLIS *et al.*, 2000b; DANGL e JONES, 2001) sugerindo que a ligação a nucleotídeos trifosfatados (ATP e GTP) seja essencial para a atividade da proteína *Sw-5*.

A linhagem Stevens, que contém o gene *Sw-5*, tem sido a principal fonte de resistência a tospovírus nos programas de melhoramento (ROSELÓ *et al.*, 1998). Entretanto, a existência de isolados que superam parcialmente ou totalmente a resistência conferida por *Sw-5* põe em dúvida a durabilidade desta resistência e reforça a necessidade da identificação de novos genes de resistência (LATHAM e JONES, 1998; LAU, 2001; ARAMBURU e MARTÍ, 2003). Vários trabalhos têm relatado fontes de resistência a tospovírus em acessos silvestres do tomateiro cultivado, principalmente das espécies *L. peruvianum*, *L. chilense* Dun. e *L. hirsutum* (PATERSON *et al.*, 1989;

KRISHNA-KUMAR *et al.*, 1993; ROSELLÓ *et al.*, 1998; LOURENÇÃO *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2003).

GUIMARÃES (2002) realizando estudos de herança da resistência originária de *L. peruvianum* acesso LA 371 demonstrou que a resistência encontrada nesse acesso é governada por um gene dominante e é efetiva contra três espécies de tospovírus (TCSV, GRSV e TSWV). Através de estudo de co-segregação entre um marcador CAPS, localizado próximo ao loco Sw-5, e o fenótipo da resistência, GUIMARÃES (2002) demonstrou que a resistência encontrada nesse acesso é devida a um alelo do gene Sw-5 ou de um loco proximamente ligado. Utilizando a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) com oligonucleotídeos que anelam no início e no final da ORF (*open reading frame*) do gene Sw-5, LAU (2004) amplificou e clonou uma seqüência homóloga ao gene Sw-5 que co-segregava com o fenótipo da resistência a tospovírus, a partir do acesso LA 371. No entanto, a análise funcional revelou que esse homólogo não é capaz de conferir resistência a tospovírus em plantas transgênicas de tomateiro (*L. esculentum* cv. Moneymaker) e tabaco (*Nicotiana tabacum* 'Havana 425') sugerindo que o gene clonado não era o responsável pela resistência encontrada neste acesso de *L. peruvianum* (LAU, 2004).

SPASSOVA *et al.* (2001) seqüenciaram aproximadamente 35 Kb de um clone BAC contendo o marcador CT220 que está ligado ao loco Sw-5 e identificaram dois genes candidatos a resistência altamente homólogos (95%) que foram denominados Sw5-a e Sw5-b. A análise funcional desses homólogos em plantas de *N. tabacum* cv. SR1 transformadas revelou que Sw5-b é necessário e suficiente para conferir resistência contra TSWV (SPASSOVA *et al.*, 2001). Com base neste estudo e em ampliações da região 5' do gene Sw-5, LAU (2004) propôs que outros homólogos, além do clonado em seu trabalho, estivessem presentes na região genômica que co-segrega com a resistência a tospovírus no acesso LA 371. Este trabalho teve por objetivo confirmar esta hipótese. Para tanto, oligonucleotídeos desenhados para anelarem nas regiões correspondentes ao início da ORF codificada pelo Sw-5 e na região 3' não traduzida do gene foram utilizados em PCR contendo como molde DNA extraído de uma planta RC₁F₂, resistente a TCSV, derivada do cruzamento entre 'Moneymaker' (*L. esculentum*) X LA 371 obtida por

GUIMARÃES (2002). Foram amplificados na mesma reação de PCR e clonados dois genes homólogos a *Sw-5* denominados de homólogo 1 e homólogo 2. A proteína putativa codificada pelo homólogo 2 é mais similar à proteína codificada pelo gene *Sw-5* (99,28%) (BRMMONSCHENKEL *et al.*, 2000) sugerindo que este homólogo seja responsável pela resistência a tospovírus encontrada em LA 371. As seqüências clonadas foram transferidas para o vetor binário pBI121 e experimentos de transformação genética de plantas de tabaco encontram-se em andamento visando à comprovação desta hipótese.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

A clonagem de homólogos do gene *Sw-5* foi realizada a partir de uma planta selecionada na população RC₁F₂ (denominada EP-1) que se encontra em homozigose para o loco que confere resistência a tospovírus. Essa população foi obtida por GUIMARÃES (2002) por meio da autofecundação de uma planta resistente a TCSV proveniente do retrocruzamento 'MoneyMaker' (*L. esculentum*) X ['MoneyMaker' x LA 371 (*L. peruvianum*)].

2.2 Clonagem e caracterização das seqüências amplificadas

O DNA da planta EP-1 foi extraído de acordo com o protocolo proposto por FULTON *et al.* (1995). A partir desse DNA foi amplificado um fragmento de aproximadamente 4,1 Kb (o que corresponde a ORF completa do gene *Sw-5* mais a região 3' não traduzida do gene) utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B (5' - GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG-3') e 19Sma2 (5' - GCA TCC CGG GCA ACA ATA AGC AG-3') (Figura 1). A reação foi composta por 100-200 ng de DNA genômico, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0.1 μM de cada oligonucleotídeo, 2 a 5 unidades do sistema enzimático ElongaseTM (Gibco-BRL) e água destilada estéril (Milli-Q) suficiente para atingir o volume final de 50 μL.

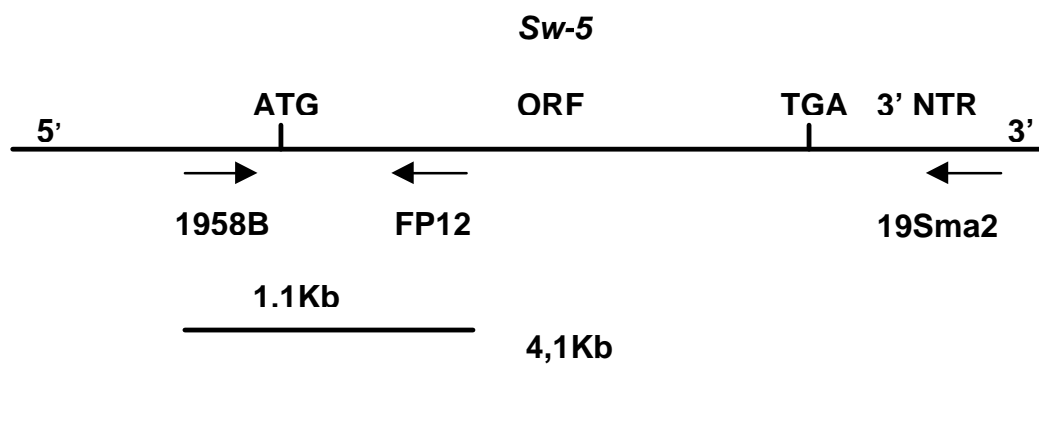


Figura 1 - Representação esquemática do gene *Sw-5* indicando as posições de anelamento dos oligonucleotídeos 1958B, 19Sma2 e FP12. As barras abaixo da representação do gene *Sw-5* indicam o tamanho dos produtos de PCR obtidos pela combinação desses oligonucleotídeos. **ORF** – “*open reading frame*”; **3'NTR** - Região 3' não traduzida.

As reações de PCR foram realizadas no aparelho Mastercycler (Eppendorf®), compostas de 40 ciclos a 94°C durante um minuto (desnaturação), 56°C por um minuto (anelamento), 68°C por dois minutos (extensão), seguidos por uma extensão final a 68°C por cinco minutos. Os fragmentos amplificados foram clonados diretamente no vetor pGEM-T easy (Promega®) seguindo as recomendações do fabricante.

Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação foi utilizada para transformar células competentes de *Escherichia coli* estirpe DH5a utilizando o método de transformação por choque térmico (SAMBROOK *et al.*, 1989). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) (SAMBROOK *et*

al., 1989) contendo ampicilina (150 mg L⁻¹), IPTG (0,2 mM) e X-GAL (40 µg mL⁻¹) e incubadas a 37°C por 12 horas. As colônias contendo plasmídeos recombinantes foram identificadas pela coloração branca e transferidas para tubos contendo 3mL de meio LB com ampicilina (150 mg L⁻¹). As colônias foram incubadas a 37°C, por 12 horas, sob agitação constante (250 rpm, CERTOMAT[®] BS-T). Os plasmídeos contendo as seqüências clonadas foram extraídos pelo método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

O DNA plasmidial foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI* que reconhecem as seqüências que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor pGEM-T easy e sítios internos da seqüência clonada. O DNA clivado foi analisado em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X (SAMBROOK *et al.*, 1989) por meio de eletroforese à voltagem constante de 100V por 1 hora e 0,2 µM de brometo de etídeo. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no fotodocumentador KODAK GEL LOGIC 200 Imaging System (Rochester, NY, USA).

2.3 Caracterização das seqüências clonadas com base na análise de restrição da região 5'

O DNA plasmidial das seqüências clonadas foi utilizado como molde na reação de PCR para a análise de restrição. Para isso, utilizou-se os oligonucleotídeos 1958B e FP12 (5'- AGG ATT TGT AGT ACG TCT CAA CTT G -3'), que anelam na região 5' do gene *Sw-5*, obtendo-se um produto amplificado de 1125 pb (Figura 1). A reação foi composta por 100-200 ng de DNA plasmidial, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,1 µM de cada oligonucleotídeo, 2 a 5 unidades da enzima *Taq polimerase* (Gibco-BRL) e água destilada estéril (Milli-Q) suficiente para atingir o volume final de 25 µL. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Mastercycler (Eppendorf[®]) compostas de 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 52°C por um minuto, 72°C por um minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por cinco minutos.

Em seguida, 10 µL dos produtos de PCR foram clivados com a enzima de restrição *RsaI* (foram utilizados 5 unidades da enzima em 2 µL do tampão,

37°C, 2 horas). Os padrões de restrição foram comparados com aqueles gerados a partir da cultivar MoneyMaker (suscetível), da linhagem SW99-1 (resistente) (BROMMONSCHENKEL e TANKSLEY, 1997) e do acesso LA 371 (resistente) (LIMA, 2001).

Os clones com padrões de restrição distintos foram selecionados para clonagem em vetor binário pBI121 (Clontech®) e armazenados em glicerol 50% a -80°C.

2.4 Seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes

Para esta finalidade, 100-200 ng de DNA plasmidial foi digerido com 5 unidades da enzima de restrição *EcoRI* em 2 µL do tampão (37°C, 2 horas) num volume final de 20 µL. O DNA clivado foi aplicado em gel de agarose a 1,2% em TAE 1X e submetido à eletroforese a 100V por 1 hora. Os fragmentos obtidos foram purificados do gel utilizando-se o Sephaglas™ BandPrep Kit e ligados no vetor pBluescript (pBKS) (Promega®). Os subclones com fragmentos maiores do que 1500 pb foram submetidos à digestão com *SacI* (5 unidades da enzima de restrição em 2 µL do tampão, 37°C, 2 horas, num volume final de 20 µL). O DNA clivado foi aplicado em gel de agarose a 1,2% em TAE 1X e submetido à eletroforese a 100V por 1 hora. Os fragmentos correspondentes ao vetor mais o inserto foram purificados do gel utilizando-se o Sephaglas™ BandPrep Kit e religados.

As ligações, foram realizadas num volume final de 10 µL, na presença de 5 µL do tampão de ligação e 5 unidades da enzima de ligação T4 DNA ligase (Promega®). A reação de ligação foi mantida a 4 °C por 18 horas. Uma alíquota de 5 µL da reação de ligação foi empregada para transformar células competentes de *E.coli* estirpe DH-5a, utilizando o método de transformação por choque térmico (SAMBROOK *et al.*, 1989). O sucesso da clonagem foi verificada mediante digestão com as enzimas *EcoRI* e *SacI*.

Para o seqüenciamento, os fragmentos *EcoRI* foram amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos T3 e T7 que anelam em regiões localizadas adjacentes ao sítio múltiplo de clonagem do vetor pBKS. Já os fragmentos *SacI*

foram amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos MT3R e T7 que anelam em regiões localizadas adjacentes ao sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM-T easy (a Figura 2 mostra uma representação das estratégias de seqüenciamento utilizadas neste trabalho). As reações de PCR foram compostas por 100-200 ng de DNA plasmidial, 2µL “*Dynamic ET terminator Premix*” (Amersham Biosciences), 0,5 µM do oligonucleotídeo iniciador e água destilada estéril (Milli-Q) suficiente para atingir o volume final de 5µL. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Mastercycler (Eppendorf®) compostas de 35 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 52°C por cinco segundos e 60°C por dois minutos. Os fragmentos amplificados foram precipitados com acetado de amônio 7,5 mM e etanol 100%, à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugados por 45 minutos (3700rpm, Centrifuge 5804R, Eppendorf®). O precipitado foi lavado com etanol 70%, secado e ressuspendido com 5µL de *loading buffer* (Amersham Biosciences). As seqüências de nucleotídeos dos clones foram determinadas em seqüenciador automático MegaBACE™ 500 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA).

A montagem da ORF e tradução da seqüência foram realizadas no programa DNAMAN versão 4.0 (Lynnon Biosoft). Utilizando-se esse mesmo programa foi feito o alinhamento das proteínas deduzidas a partir das seqüências clonadas com a proteína codificada pelo gene *Sw-5* clonado a partir da linhagem SW99-1 de tomateiro (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000), com a seqüência de aminoácidos das proteínas Sw5-a e Sw5-b obtidas por SPASSOVA *et al.* (2001) a partir de *L. esculentum* cv. Stevens (*GenBank*, acesso número AY 007366.1), com a proteína do homólogo clonado por LAU (2004) (pGPP333) obtida a partir do acesso LA 371 de *L. peruvianum* e com a proteína codificada a partir de *L. esculentum* cv. Moneymaker (LAU, 2004).

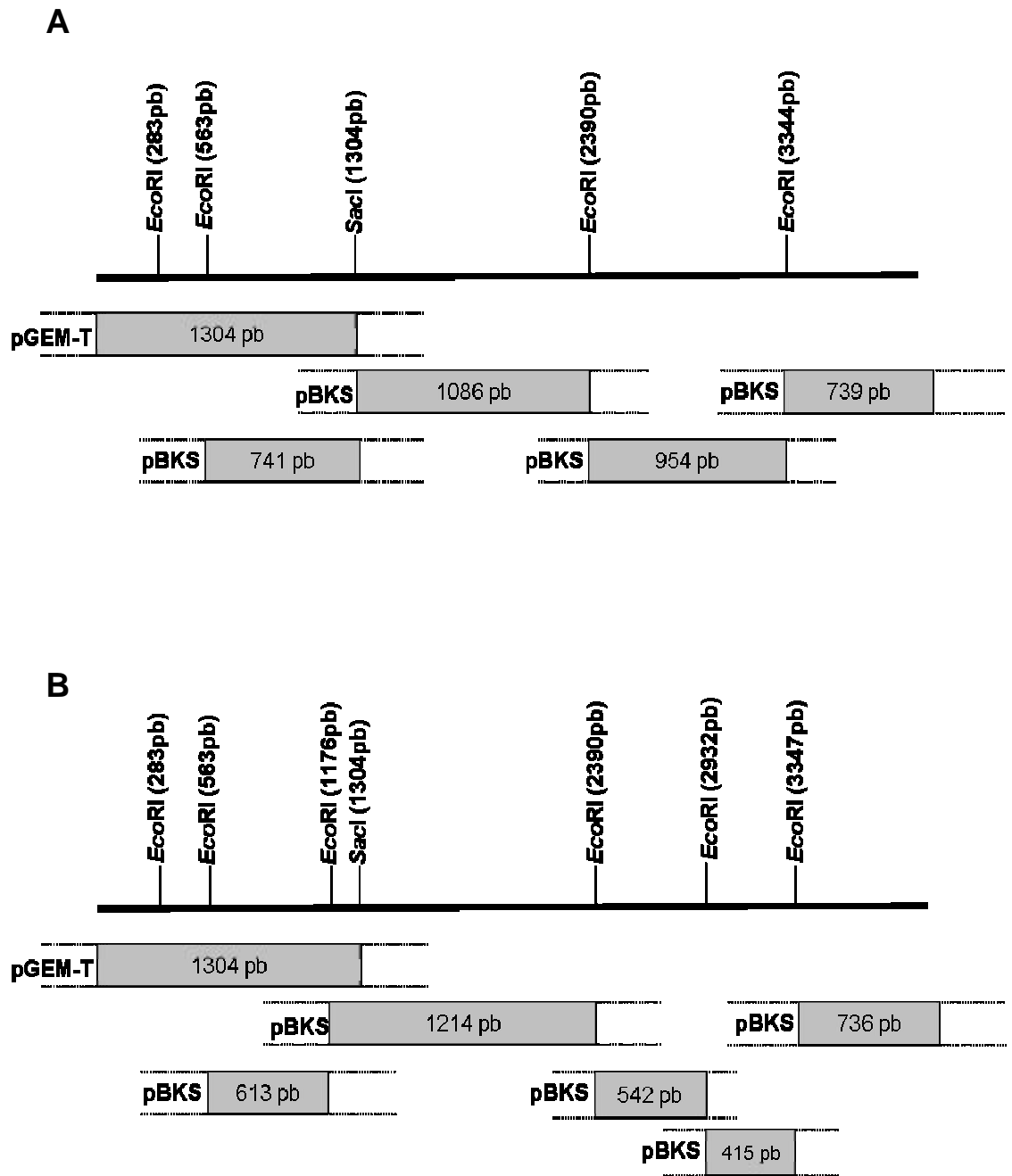


Figura 2 – Subclonagens utilizadas para o seqüenciamento dos genes A e B amplificados a partir do acesso LA 371. Na figura encontram-se representados os fragmentos *EcoRI* e *SacI* clonados no vetor pBKS e pGEM-T, respectivamente.

2.5 Modificação do sítio múltiplo de clonagem do vetor binário pBI121

Para evitar a clonagem das seqüências no sítio *Sma*I do vetor binário pBI121 em conjunto com o gene *Gus* foi efetuada a remoção desse gene por meio da dupla clivagem com as enzimas *Sac*I e *Xba*I removendo, conseqüentemente, o sítio *Sma*I do vetor. Como o fragmento amplificado (4,1Kb) é flanqueado por sítios de restrição da enzima *Sma*I contidos nos oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA, foi necessário inserir novamente o sítio *Sma*I no vetor pBI121. Para isso, um fragmento de aproximadamente 1500 pb do clone pGPP393 delimitado por sítios de clivagem da enzima *Bam*HI foi clonado no sítio *Bam*HI do vetor pUC19 para se obter um fragmento *Sac*I/*Xba*I de aproximadamente 1528 pb, contendo um sítio de clivagem para *Sma*I posterior ao sítio *Sac*I e anterior ao sítio para *Bam*HI. Esse fragmento foi então clonado no sítio *Sac*I/*Xba*I do vetor pBI121 e posteriormente digerido com a enzima de restrição *Bam*HI para que o fragmento do clone pGPP393 fosse liberado e o vetor pBI121 tivesse um sítio de clonagem constituídos pelos sítios *Sac*I, *Kpn*I, *Sma*I, *Bam*HI e *Xba*I.

2.6 Transferência das seqüências clonadas para o vetor binário pBI121

As seqüências clonadas obtidas a partir do acesso LA 371 (item 2.2) foram transferidas para o vetor binário pBI121 mediante digestão com a enzima de restrição *Sma*I e separadas do vetor (pGEM-T easy) por eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Após a purificação, utilizando o Sephaglas™ BandPrep Kit, os fragmentos foram ligados no sítio *Sma*I do vetor binário pBI121 (item 2.5), de modo que a expressão da ORF da seqüência homóloga fosse direcionada pelo promotor 35S do CaMV (*Cauliflower mosaic virus*). Os plasmídeos recombinantes dos clones contendo as seqüências clonadas foram extraídos pelo método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). A confirmação dos plasmídeos recombinantes e a determinação da orientação dos insertos foram realizadas por meio da clivagem com a enzima de restrição *Hind*III. Os clones

com orientação senso foram transferidos por eletroporação para a estirpe LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. A detecção das colônias recombinantes foi realizada por PCR de colônias utilizando-se o par de oligonucleotídeos 1958B/FP12 e as mesmas condições de PCR descritas no item 2.3.

3. RESULTADOS

3.1 Clonagem e caracterização molecular dos homólogos do gene *Sw-5*

Empregando-se os oligonucleotídeos desenhados com base na seqüência do gene *Sw-5*, foi amplificado um fragmento de aproximadamente 4,1Kb (Figura 3) a partir do DNA extraído das plantas EP-1 (resistente a TCSV), da cultivar Moneymaker (suscetível a tospovírus) e da linhagem SW99-1 (resistente a tospovírus). O produto da PCR da planta EP-1 foi clonado no vetor pGEM-T easy e várias colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram selecionadas e estocadas em glicerol 50% a -80°C. A clivagem dos plasmídeos extraídos a partir dessas colônias com a enzima de restrição *EcoRI* revelou a existência de clones com padrões diferentes de restrição, indicando a amplificação e clonagem de pelo menos duas seqüências distintas (Figura 4).

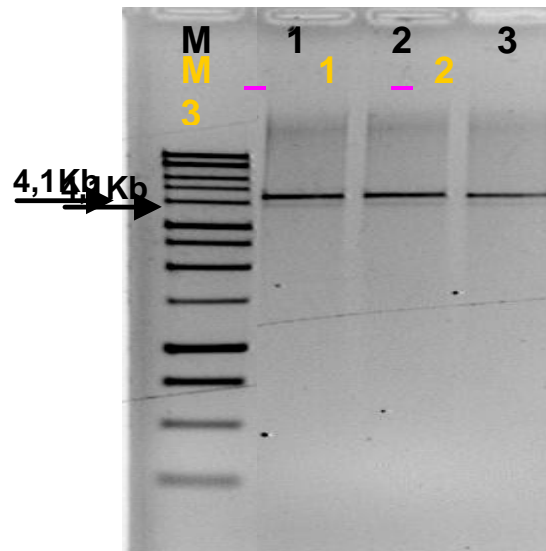


Figura 3 – Análise do produto de amplificação do DNA genômico utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B/19Sma2 e visualizados em gel de agarose a 1,2% em TAE 1%. **1** - EP-1 (Planta obtida a partir do acesso LA 371 de *L. peruvianum*) (GUIMARÃES, 2002); **2** – *L. esculentum* cv. Moneymaker; **3** – Linhagem SW99-1 (BROMMONSCHENKEL e TANKSLEY, 1997); **M** – Padrão de comprimento de DNA “1Kb Ladder”.

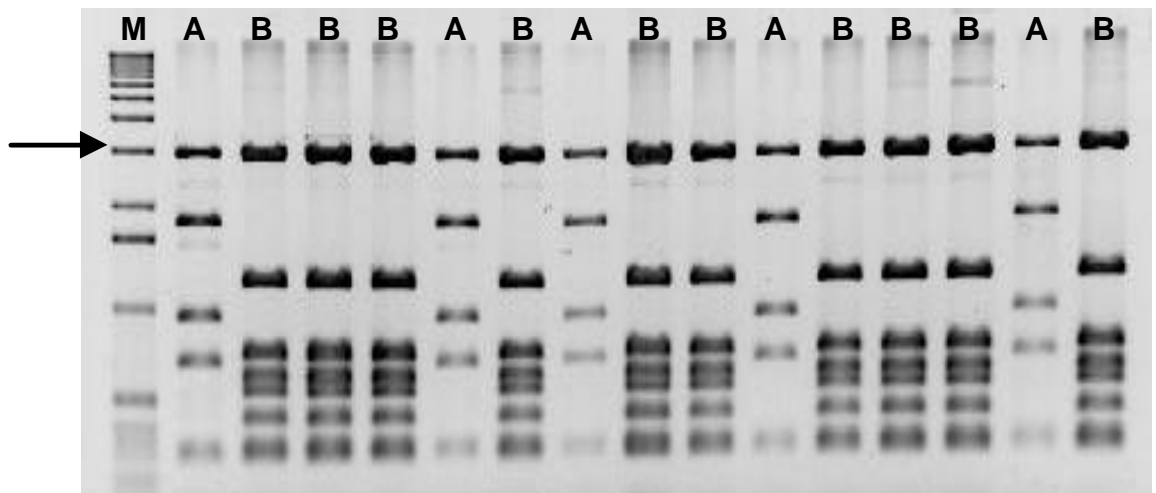


Figura 4 - Padrão de restrição *EcoRI* dos insertos dos plasmídeos recombinantes. Notar os dois padrões de restrição obtidos (A e B). **M** – Padrão de comprimento de DNA “1Kb Ladder”. A seta indica o vetor pGEM-T easy (3,0 Kb).

Utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B e FP12 que anelam na região 5' do gene *Sw-5* obteve-se um produto amplificado de 1125 pb a partir de todos os plasmídeos. A clivagem deste produto com a enzima de restrição *RsaI* (Figura 5) confirmou os resultados obtidos pela clivagem dos plasmídeos com *EcoRI*, demonstrando a clonagem de duas seqüências diferentes. Assim, o inserto com o padrão de restrição A (Figuras 4 e 5) foi denominado homólogo 1 e aquele com o padrão de restrição B (Figuras 4 e 5) denominado de homólogo 2. Em conjunto, esses fragmentos correspondem aos fragmentos amplificados da planta EP-1 (Figura 5), comprovando a amplificação de duas seqüências diferentes a partir desta planta.

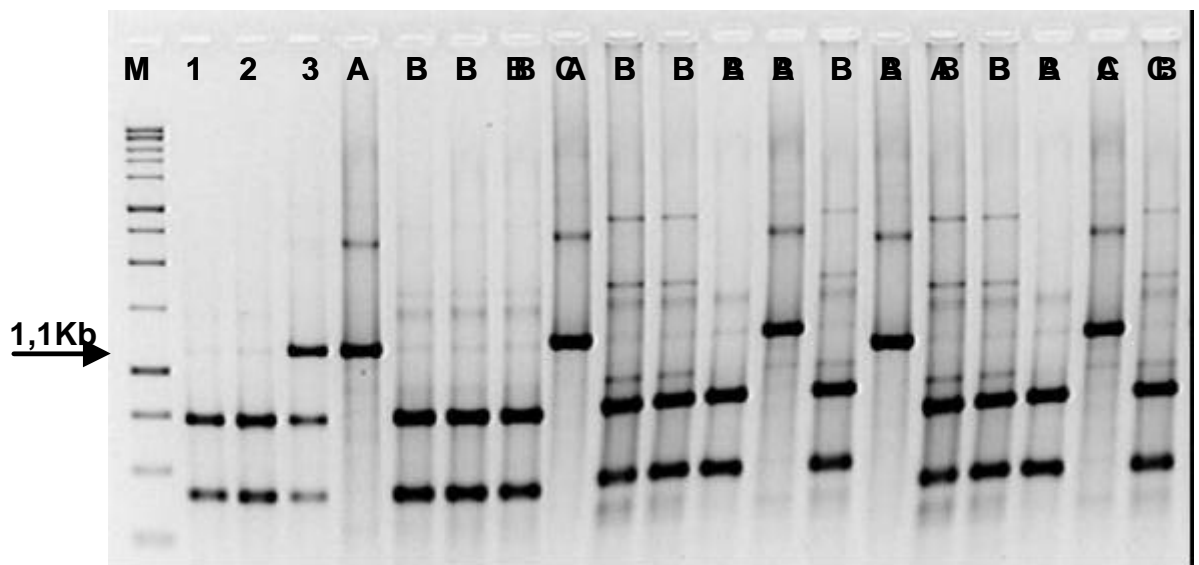


Figura 5 – Padrão de restrição *RsaI* dos fragmentos amplificados por PCR a partir do DNA plasmidial utilizando os oligonucleotídeos 1958B e FP12 que pareiam na região 5' do gene *Sw-5*. **M** – Padrão de comprimento de DNA “1Kb Ladder”; **1** – *L. esculentum* cv. Moneymaker; **2** – Linhagem SW99-1 (BROMMONSCHENKEL e TANKSLEY, 1997); **3** - Planta LA 371; **A** – homólogo 1; **B** – homólogo 2.

3.2 Seqüenciamento dos homólogos do gene *Sw-5*

As análises das seqüências obtidas revelaram que o homólogo 1 contém uma ORF que codifica uma proteína de 1244 aminoácidos e o homólogo 2 contém uma ORF que codifica uma proteína de 1246 aminoácidos. Considerando a ORF completa, a proteína 2 apresenta 92,94% de identidade com a proteína codificada pelo homólogo 1 e 99,28% de identidade com a proteína codificada pelo gene *Sw-5* clonado por BROMMONSCHENKEL *et al.* (2000). A proteína codificada pelo homólogo 1 apresenta 93,42% de identidade com a proteína *Sw-5*. Quando comparadas com as outras seqüências analisadas, observou-se uma maior identidade entre o homólogo 2 e as proteínas *Sw5-b* (99,92%) e *Sw-5* (99,28%), respectivamente. A proteína codificada pelo homólogo 1 apresenta uma identidade de 99,44% com a proteína codificada pelo homólogo clonado por LAU (2004) denominado pGPP333 e uma menor identidade com outras proteínas comparadas (Tabela 1).

Quando comparações de seqüências foram realizadas separadamente para cada um dos domínios que compõem a proteína, verificou-se que as regiões mais divergentes foram a extremidade amino e as LRR's (Tabelas 2 e 3). No caso da extremidade amino, a identidade variou de 88,50 a 100%, enquanto que para as LRR's a variação observada foi ligeiramente menor 87,58 a 100%. Maiores valores de identidade foram verificados para o domínio NBS com valores variando de 97,51 a 100% (Tabela 4).

Com base na identidade de aminoácidos das proteínas comparadas foi construída a árvore de identidade. Com base na árvore, verificou-se uma maior identidade entre as proteínas do homólogo 2, *Sw5-b* e *Sw-5*, respectivamente. Uma menor identidade foi observada entre as proteínas do homólogo 2, *Sw5-a*, pGPP333 e Moneymaker (Figura 6).

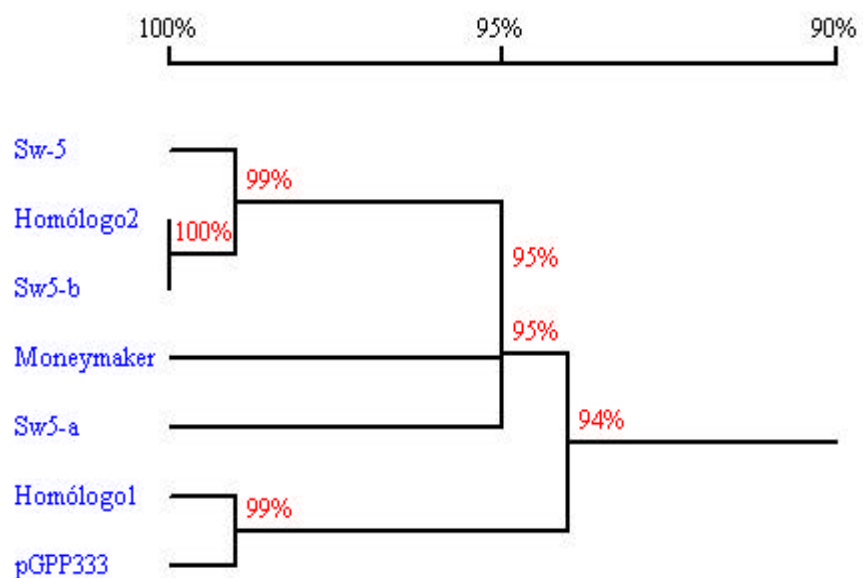


Figura 6 – Árvore construída com base na identidade de aminoácidos das proteínas codificadas por genes presentes na região do locus *Sw-5* das cultivares Stevens (*Sw5-a* e *Sw5-b*) (SPASSOVA *et al.*, 2001), Moneymaker (LAU, 2004), da linhagem SW99-1 (*Sw-5*) (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000), do acesso LA371 (pGPP333) (LAU, 2004) e dos homólogos 1 e 2.

Tabela 1 – Percentual de identidade, ao nível de aminoácidos, entre homólogos do gene Sw-5 considerando-se a **ORF completa**. **1** – homólogo 1; **2** – homólogo 2; **Sw5-a** e **Sw5-b** – proteínas codificadas pelos genes *Sw5-a* e *Sw5-b* (SPASSOVA *et al.*, 2001); **Sw-5** – proteína codificada pela linhagem SW99-1 (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000); **pGPP333** – proteína codificada pelo aceso LA 371 (LAU, 2004); **MM** – proteína codificada pela cultivar Moneymaker (LAU, 2004).

	1	2	Sw5-a	Sw5-b	Sw-5	pGPP333	MM
1							
2	92,94						
Sw5-a	93,50	95,02					
Sw5-b	93,02	99,92	95,10				
Sw-5	93,42	99,28	95,75	99,36			
pGPP333	99,44	93,18	93,90	93,26	93,66		
MM	93,42	95,02	94,38	95,10	95,75	93,66	

Tabela 2 – Percentual de identidade, ao nível de aminoácidos, entre homólogos do gene Sw-5 considerando-se a **extremidade amino**. **1** – homólogo 1; **2** – homólogo 2; **Sw5-a** e **Sw5-b** – proteínas codificadas pelos genes *Sw5-a* e *Sw5-b* (SPASSOVA *et al.*, 2001); **Sw-5** – proteína codificada pela linhagem SW99-1 (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000); **pGPP333** – proteína codificada pelo aceso LA 371 (LAU, 2004); **MM** – proteína codificada pela cultivar Moneymaker (LAU, 2004).

	1	2	Sw5-a	Sw5-b	Sw-5	pGPP333	MM
1							
2	88,50						
Sw5-a	90,71	96,90					
Sw5-b	88,94	99,56	97,35				
Sw-5	89,82	97,79	99,56	97,79			
pGPP333	99,12	88,94	90,27	88,94	89,82		
MM	90,71	90,27	92,92	90,71	92,92	90,71	

Tabela 3 – Percentual de identidade ao nível de aminoácidos, entre homólogos do gene Sw-5 considerando-se a **as repetições ricas em leucina (LRR)**. **1** – homólogo 1; **2** – homólogo 2; **Sw5-a** e **Sw5-b** – proteínas codificadas pelos genes *Sw5-a* e *Sw5-b* (SPASSOVA *et al.*, 2001); **Sw-5** – proteína codificada pela linhagem SW99-1 (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000); **pGPP333** – proteína codificada pelo aceso LA 371 (LAU, 2004); **MM** – proteína codificada pela cultivar Moneymaker (LAU, 2004).

	1	2	Sw5-a	Sw5-b	Sw-5	pGPP333	MM
1							
2	88,88						
Sw5-a	89,09	89,09					
Sw5-b	88,79	100,00	89,09				
Sw-5	88,79	99,09	90,30	99,09			
pGPP333	99,70	87,88	89,09	87,88	89,09		
MM	88,18	92,73	91,19	92,73	93,64	88,48	

Tabela 4 – Percentual de identidade, ao nível de aminoácidos, entre homólogos do gene Sw-5 considerando-se a **o domínio NBS (Nucleotide Binding)**. **1** – homólogo 1; **2** – homólogo 2; **Sw5-a** e **Sw5-b** – proteínas codificadas pelos genes *Sw5-a* e *Sw5-b* (SPASSOVA *et al.*, 2001); **Sw-5** – proteína codificada pela linhagem SW99-1 (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000); **pGPP333** – proteína codificada pelo aceso LA 371 (LAU, 2004); **MM** – proteína codificada pela cultivar Moneymaker (LAU, 2004).

	1	2	Sw5-a	Sw5-b	Sw-5	pGPP333	MM
1							
2	97,87						
Sw5-a	97,16	97,16					
Sw5-b	97,87	100,00	97,16				
Sw-5	98,58	100,00	97,16	100,00			
pGPP333	98,94	98,58	97,87	98,58	98,58		
MM	98,58	99,29	97,87	99,29	99,29	99,29	

O alinhamento das seqüências obtidas revelou que a divergência de seqüência dos homólogos analisados é devida a substituições de aminoácidos distribuídas de maneira não uniforme e a um códon de terminação na posição 1245 para o homólogo 1 (Figura 7). As substituições estão concentradas na região amino-terminal e na região que contém as LRR's. A proteína codificada pelo homólogo 2 difere da proteína Sw-5b obtida por SPASSOVA *et al.* (2001) por apresentar alanina ao invés do aminoácido valina (posição 36 da seqüência consenso) e da proteína Sw-5 obtida por BROMMONSCHENKEL *et al.* (2000) em 8 aminoácidos. Todos os homólogos analisados possuem quatorze LRR's, das quais, cinco repetições são idênticas. Entretanto, a proteína codificada pelo homólogo 1 apresenta nas LRR's nove repetições que diferem em algum aminoácido das outras seqüências analisadas.

No total, os homólogos clonados (homólogo 1 e homólogo 2) diferem em 82 substituições ao nível de aminoácidos ao longo de toda a ORF. A grande maioria dessas substituições se concentra na extremidade amino e nas LRR's (Figura 7).

```

Sw-5 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLDWLDILRIEELEMVLRVFRFTFKYHDVLLPDSLVELTK 60
MM MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLDFWLDILRIGELEMVLRVFRFTFKYHDVLLPDSLVLKLT 60
Sw5-a MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLDWLDILRIEELEMVLRVFRFTFKYHDVLLPDSLVELTK 60
Sw5-b MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLDWLDILRIEELEMVLRVFRFTFKYNDVLLPDSLVELTK 60
333 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLDFGILQIEEVEMVLRVFRFTFKYNDVLLPDSLVELTK 60
Hom1 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLDFGILQIEEVEMVLRVFRFTFKYNDVLLPDSLVELTK 60
Hom2 MAENEIEEMLEHLRRIKSGGDLDWLDILRIEELEMALRVFRFTFKYNDVLLPDSLVELTK 60
*****.***** **.*.* ** *****.***** **

Sw-5 RAKLTGEILHRVLGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMD 120
MM MAKLTGEILHRVLGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSRNYELNDFDLSKYMD 120
Sw5-a RAKLTGEILHRVLGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMD 120
Sw5-b RAKLIGEILHRLFGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMD 120
333 RAKLSGEILHRVLGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMD 120
Hom1 RAKLSGEILHRVLGRIPHKCKTNLSLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMD 120
Hom2 RAKLIGEILHRLFGRIPHKCKTNLNLERLESHLLEFFQGNTASLSHNYELNDFDLSKYMD 120
*** *****.***** *****.***** *****

Sw-5 CLENFLNDVLMFQKDRFFHSREQLAKHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
MM CLENFLNDVLMFQKGRSCHSKRKLAKHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
Sw5-a CLENFLNDVLMFQKDRFFHSREQLAKHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
Sw5-b CLENFLNDVLMFQKDRFFHSREQLAKHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
333 CLENFLNDLLMMFLYEGRSCHSIKQLAIHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
Hom1 CLENFLNDLLMMFLYEGRSCHSIKQLAIHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
Hom2 CLENFLNDVLMFQKDRFFHSREQLAKHRSIKELKIVQKKIRFLKYIYATEINGYVDYE 180
*****.***** * ** .** ***** *****

Sw-5 KQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSPKPPYLLSLIVLVELEMKKIF 240
MM KQECLEIRIQFMTNTVGQYCVAVLDYVGEGLNDENDNFSPKPPYLLSLIVFVELEMMKLF 240
Sw5-a KQECLETRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSPKPPYLLSLIVLVELEMKKIF 240
Sw5-b KQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSPKPPYLLSLIVLVELEMKKIF 240
333 KQECLETRIQFMTNTVGQYCVAVLDYVAECELNDENDNFSPKPPYLLSLIVFVELEMMKLF 240
Hom1 KQECLETRIQFMTNTVGQYCVAVLDYVAECELNDENDNFSPKPPYLLSLIVFVELEMKKIF 240
Hom2 KQECLENRIQFMTNTVGQYCLAVLDYVTEGKLNENDNFSPKPPYLLSLIVLVELEMKKIF 240
***** *****.***** * ** .***** ***** *.*

Sw-5 HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSHHLHNLMLYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
MM HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSHHLHNLMLYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
Sw5-a HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSHHLHNLMLYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
Sw5-b HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSHHLHNLMLYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
333 HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSHHLHNLMLYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
Hom1 HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSHHLHNLMLYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
Hom2 HGEVKASKFTQSKTFKDKKLPKGFSHHLHNLMLYLRNKKLENFPNNIAAQNIDVAIEFLL 300
*****.***** *****

```

Figura 7 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos homólogos 1 e 2 clonados a partir do acesso LA 371. **Sw-5** – seqüência da proteína codificada pelo gene *Sw-5*, clonado a partir da linhagem SW99-1 (BROMMONSCHENKEL *et al.*, 2000); **MM** – seqüência da proteína codificada pelo homólogo clonado a partir de *L. esculentum* cv. Moneymaker (LAU, 2004); **333** – seqüência da proteína codificada pelo homólogo clonado a partir do acesso LA 371 (LAU, 2004); **Sw5-a e Sw5-b** – seqüências das proteínas codificadas pelos genes *Sw5-A* e *Sw5-B*, respectivamente, clonados a partir de *L. esculentum* cv. Stevens (SPASSOVA *et al.*, 2001) depositada no *GenBank* acesso número AY 007366.1. Os limites dos domínios NBS estão demarcados por seta.

Sw-5 VFLDADVSNHIVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
MM VFLDADVSNHIVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
Sw5-a VFLDADVSNHIVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
Sw5-b VFLDADVSNHIVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
333 VFLDADVSNHIVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
Hom1 VFLDADVSNHIVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360
Hom2 VFLDADVSNHIVINGNWLKVKVLLKVGAIAGDILYVIQKLLPRSINKDETSNISLCSIQILE 360

Sw-5 KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNEMSTSKSGLGFLMKPLLGNL 420
MM KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNEMSTSKSGLGFLMKPLLGNL 420
Sw5-a KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNEMSTSKSGLGFLMKPLLGNL 420
Sw5-b KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNEMSTSKSGLGFLMKPLLGNL 420
333 KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNEMSTSKSGLGFLMKPLLGNL 420
Hom1 KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNEMSTSKSGLGFLMKPLLGNL 420
Hom2 KTKDLKAQVETYYKSLKFTPSQFPTFGGLSFLNSLLRKLNEMSTSKSGLGFLMKPLLGNL 420

Sw-5 EKELSSLTSILEKELSSIFRDVVHHEHNIPKDLQRRRTINLSYEA EVAIDSILAQYNAFLH 480
MM EKELSSLTSILEKELSSIFRDVVHHDHNIPKDLQRRRTINLACEAEVAIDSILAQYNVFLH 480
Sw5-a EKELSSLTSILEKELSSIFSDVVHHEHNIPKDLQRRRTINLAYEAEVAIDSILAQYNAFLH 480
Sw5-b EKELSSLTSILEKELSSIFRDVVHHEHNIPKDLQRRRTINLSYEA EVAIDSILAQYNAFLH 480
333 EKELSSLASILEKELSSIFSDVVHHEHSIPKDLQRRRTINLAYEAEVAIDSILAQYNVFLH 480
Hom1 EKELSSLASILEKELSSIFSDVVHHEHSIPKDLQRRRTINLAYEAEVAIDSILAQYNVFLH 480
Hom2 EKELSSLTSILEKELSSIFRDVVHHEHNIPKDLQRRRTINLSYEA EVAIDSILAQYNAFLH 480

?

Sw-5 IFCSLPTIVKEIKQINA EVTEMWSADIPLNPHYVAAPLKHL PDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
MM IFCSLPTIVKEIKQINA EVTEMWSADIPLNPHYVAAPLKHL PDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
Sw5-a IFCSLPTIVKEIKQINVEVTEMWSTDIPLNPHYVAAPLKHL PDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
Sw5-b IFCSLPTIVKEIKQINA EVTEMWSADIPLNPHYVAAPLKHL PDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
333 IFCSLPTIVKEIKQINA EVTEMWLADIPLNPHYVAAPLKYL PDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
Hom1 IFCSLPTIVKEIKQINA EVTEMWLADIPLNPHYVAAPLKYL PDRHSNLVTDEEVVGFENK 540
Hom2 IFCSLPTIVKEIKQINA EVTEMWSADIPLNPHYVAAPLKHL PDRHSNLVTDEEVVGFENK 540

Cinase-1a

Sw-5 AEELIDYLRGTNELDVVPIVGMGGQGKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRR 600
MM AEELIDYLRGTNELDVVPIVGMGGQGKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRR 600
Sw5-a AEELIDYLTRGTNELDVVPIVGMGGQGKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRI 600
Sw5-b AEELIDYLRGTNELDVVPIVGMGGQGKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRR 600
333 AEELIDYLRGTNELDVVPIVGMGGQGKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNQR 600
Hom1 AEELIDYLRGTNELDVVPIVGMGGQGKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNQR 600
Hom2 AEELIDYLRGTNELDVVPIVGMGGQGKTTIARKLYNNDIIVSRFDVRAWCIISQTYNRR 600

Cinase-2a

Sw-5 ELLQDIFSQVTGSDDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFPDDG 660
MM ELLQDIFSQVTGFNDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFPDDG 660
Sw5-a ELLQDIFSQVTGFNDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFPDVG 660
Sw5-b ELLQDIFSQVTGSDDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFPDDG 660
333 ELLQDIFSQVTGFNDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFPDVG 660
Hom1 GLLQDIFSQVTGFNDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFPDVG 660
Hom2 ELLQDIFSQVTGSDDNGATVDVLADMLRRKLMGKRYLIVLDDMWDCMVWDDLRLSFPDDG 660

Figura 7, continua.

Cinase-3a

Sw-5	IR <u>SRIVVTTTRLEEV</u> GKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV	720
MM	IR <u>SRIVVTTTRLEEV</u> GKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV	720
Sw5-a	IR <u>SRIVVTTTRLEEV</u> GKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPELQDVSQAV	720
Sw5-b	IR <u>SRIVVTTTRLEEV</u> GKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV	720
333	IR <u>SRIVVTTTRLEEV</u> GKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV	720
Hom1	IR <u>SRIVVTTTRLEEV</u> GKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV	720
Hom2	IR <u>SRIVVTTTRLEEV</u> GKQVKYHTDPYSLPFLTTEESCQLLQKKVFQKEDCPPPELQDVSQAV	720

Sw-5	AEKCKGLPLVVVLVAGI IKKRKMEESSWNEVKDALFDYLDSEFEEYSLATMQLSFDNLPH	780
MM	AEKCKGLPLVVVLVAGI IKKRKMEESSWNEVKDALFDYLDSEFEEYSLATMQLSFDNLPH	780
Sw5-a	AEKCKGLPLVVVLVAGI IKKRKMEESSWNEVKDALFDYLDSEFEEYSLATMQLSFDNLPH	780
Sw5-b	AEKCKGLPLVVVLVAGI IKKRKMEESSWNEVKDALFDYLDSEFEEYSLATMQLSFDNLPH	780
333	AEKCKGLPLVVVLVAGI IKKRKMEESSWNEVKDALFDYLDSEFEEYSLATMQLSFDNLPH	780
Hom1	AEKCKGLPLVVVLVAGI IKKRKMEESSWNEVKDALFDYLDSEFEEYSLATMQLSFDNLPH	780
Hom2	AEKCKGLPLVVVLVAGI IKKRKMEESSWNEVKDALFDYLDSEFEEYSLATMQLSFDNLPH	780

	?	
Sw-5	CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLMDLISSNLVM	840
MM	CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLMDLISSNLVM	840
Sw5-a	CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLMDLISSNLVM	840
Sw5-b	CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLMDLISSNLVM	840
333	CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLMDLISSNLVM	840
Hom1	CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLMDLISSNLVM	840
Hom2	CLKPCLLYMGMFSEDARIPASTLISLWIAEGFVENTESGRLMEEEEAEGYLMDLISSNLVM	840

Sw-5	LSKRTYKGRVKYQCQVHDVVHFFCLEKSREAKFMLAVKGQYIHFQPSDWKGRVVSFSFSEE	900
MM	LSKRTYKGRVKYQCQVHDVVHFFCLEKSREAKFMLAVKGQYIQFQPLDWKGRGGFSFSEE	900
Sw5-a	LSKRSYKGVKVKYQCQVHDVVHFFCLEKSREAKFMLAVKGQYIHFQPSDWKGRVVSFSFSEE	900
Sw5-b	LSKRTYKGRVKYQCQVHDVVHFFCLEKSREAKFMLAVKGQYIHFQPSDWKGRVVSFSFSEE	900
333	LSKRSYKGVKVKYQCQVHDVVHFFCLEKSREAKFMLAVKGQYIHFQPSDWKGRVVSFSFSEE	900
Hom1	LSKRSYKGRVKYQCQVHDVVHFFCLEKSREAKFMLAVKGQYIHFQPSDWKGRVVSFSFSEE	900
Hom2	LSKRTYKGRVKYQCQVHDVVHFFCLEKSREAKFMLAVKGQYIHFQPSDWKGRVVSFSFSEE	900
	**** . *** . ***** * . *** ***** *****	
	1	
Sw-5	LSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAKSINDIFSCQ <u>ISELRLK</u> VLDLSSYIVEFLSL	960
MM	LSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAESIDVILFCQ <u>ISELRLK</u> VLDLSSYTVEFLSL	960
Sw5-a	LSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAKSIDVILFCQ <u>ISELRLK</u> VLDLSSYTVEFLSL	960
Sw5-b	LSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAKSINDIFSCQ <u>ISELRLK</u> VLDLSSYIVEFLSL	960
333	LSKFSSLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAESIDEILFCQ <u>ISELRLK</u> VLDLSSYTVEFLSL	960
Hom1	LSKFSSLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAESIDEILFCQ <u>ISELRLK</u> VLDLSSYTVEFLSL	960
Hom2	LSKFASLVSKTQKPFHQHLRSLITTNRAKSINDIFSCQ <u>ISELRLK</u> VLDLSSYIVEFLSL	960
	**** . ***** * * * * ***** *****	
	2	3
Sw-5	ATFKPLNQL <u>LKYLAVQA</u> FEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPPYYDILLPVSFWEMKK <u>LRHAHF</u>	1020
MM	ATFKPLNQL <u>LKYLAVQA</u> ADKFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPPYG-IGLPVSFWEMKK <u>LRHAHF</u>	1019
Sw5-a	AKFKPLNQL <u>LKYLAVKA</u> ADKFYFDPGSHLPHIETFIVKNFCYG-MGLPVSFWEMKK <u>LRHAHF</u>	1019
Sw5-b	ATFKPLNQL <u>LKYLAVQA</u> FEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPPYYDILLPVSFWEMKK <u>LRHAHF</u>	1020
333	ATFKPLNQL <u>LKYLAVEA</u> YKFYFDPGSHLPHIETFIVKNLPPYYDILLPVSFWEMKK <u>LRHAHF</u>	1020
Hom1	ATFKPLNQL <u>LKYLAVEA</u> YKFYFDPGSHLPHIETFIVKNLPPYYDILLPVSFWEMMRK <u>LRHAHF</u>	1020
Hom2	ATFKPLNQL <u>LKYLAVQA</u> FEFYFDPGSHLPHIETFIVMNLPPYYDILLPVSFWEMKK <u>LRHAHF</u>	1020
	* ***** * ***** * * ***** *****	

Figura 7, continua.

	4	5	6	
Sw-5	<u>GKAEFDKQGLSEGS</u> <u>SKLENLRILK</u> <u>NIVGFDRVDVLSRRC</u> <u>PNLQQIQITY</u> <u>FGNNEEPFCPK</u>			1080
MM	<u>GKAEFDKQGLSEGS</u> <u>SKLENLRILK</u> <u>NVIQFDRVDVLSRRC</u> <u>PNLQQIQITY</u> <u>FGNNEEPFCPK</u>			1079
Sw5-a	<u>GNAEFDKQGLFEGS</u> <u>STLENLRILK</u> <u>NIIGFDGVDVLSRRC</u> <u>PNLQQIQITY</u> <u>FGNDEEPPFTP</u>			1079
Sw5-b	<u>GKAEFDKQGLSEGS</u> <u>SKLENLRILK</u> <u>NIVGFDRVDVLSRRC</u> <u>PNLQQIQITY</u> <u>FGNNEEPFCPK</u>			1080
333	<u>GKAEFDKQGLFEGS</u> <u>SKLENLRILK</u> <u>NIIGFDGVDVLSRRC</u> <u>PNLQQIKITY</u> <u>FGIDEEPPFTP</u>			1080
Hom1	<u>GKAEFDKQGLFEGS</u> <u>SKLENLRILK</u> <u>NIIGFDGVDVLSRRC</u> <u>PNLQQIKITY</u> <u>FGIDEEPPFTP</u>			1080
Hom2	<u>GKAEFDKQGLSEGS</u> <u>SKLENLRILK</u> <u>NIVGFDRVDVLSRRC</u> <u>PNLQQIQITY</u> <u>FGNNEEPFCPK</u>			1080
	* * * * * * * *			
	7	8	9	10
Sw-5	<u>LENLTQ</u> <u>LQQQLQ</u> <u>LSFARPR</u> <u>TLSGLQ</u> <u>LPSN</u> <u>LNKL</u> <u>VLEG</u> <u>IHIESV</u> <u>IPFIAG</u> <u>LPS</u> <u>LEYLQ</u> <u>LQDV</u>			1140
MM	<u>LENLTQ</u> <u>LQQQLQ</u> <u>LSFARPR</u> <u>TLSGLQ</u> <u>LPSN</u> <u>LNKL</u> <u>VLEG</u> <u>IHIESV</u> <u>IPFIAG</u> <u>LPS</u> <u>LEYLRLQ</u> <u>DV</u>			1139
Sw5-a	<u>LENLTQ</u> <u>LQQQLQ</u> <u>LSFARPH</u> <u>TLSGLQ</u> <u>LPSN</u> <u>LNKL</u> <u>VLEG</u> <u>IHIESV</u> <u>ISFIAG</u> <u>LPS</u> <u>LEYLQ</u> <u>LQDV</u>			1139
Sw5-b	<u>LENLTQ</u> <u>LQQQLQ</u> <u>LSFARPR</u> <u>TLSGLQ</u> <u>LPSN</u> <u>LNKL</u> <u>VLEG</u> <u>IHIGCV</u> <u>IPFIAG</u> <u>LPS</u> <u>LEYLQ</u> <u>LHDV</u>			1140
333	<u>FDNLTQ</u> <u>LQQQLRLSS</u> <u>VSPHT</u> <u>TLSGLQ</u> <u>LPSN</u> <u>LNKL</u> <u>VLEG</u> <u>IHIESV</u> <u>IPFIAG</u> <u>LPS</u> <u>LEYLQ</u> <u>LQDV</u>			1140
Hom1	<u>FDNLTQ</u> <u>LQQQLRLSS</u> <u>VSPHT</u> <u>TLSGLQ</u> <u>LPSN</u> <u>LNKL</u> <u>VLEG</u> <u>IHIESV</u> <u>IPFIAG</u> <u>LPS</u> <u>LEYLQ</u> <u>LQDV</u>			1140
Hom2	<u>LENLTQ</u> <u>LQQQLQ</u> <u>LSFARPR</u> <u>TLSGLQ</u> <u>LPSN</u> <u>LNKL</u> <u>VLEG</u> <u>IHIGCV</u> <u>IPFIAG</u> <u>LPS</u> <u>LEYLQ</u> <u>LHDV</u>			1140
 * * * * * * *			
	11	12		
Sw-5	<u>CFPQSEEWCLGDIT</u> <u>FHKLKLLK</u> <u>LVKLNIS</u> <u>RWDVSEES</u> <u>FP</u> <u>PLETLV</u> <u>IKKCID</u> <u>LEEIPLS</u> <u>F</u>			1200
MM	<u>CFPQSEEWCLGDIT</u> <u>FHKLKLLK</u> <u>LVKLNIS</u> <u>RWDVSEES</u> <u>FP</u> <u>PLETLV</u> <u>IKKCGD</u> <u>LEEIPVS</u> <u>F</u>			1199
Sw5-a	<u>CFPQSEEWCLGDIT</u> <u>FPKLKLLK</u> <u>LVNLPIS</u> <u>RWDVSEES</u> <u>FP</u> <u>PLETFV</u> <u>IKKCDD</u> <u>LEEIPLS</u> <u>FV</u>			1199
Sw5-b	<u>CFPQSEEWCLGDIT</u> <u>FHKLKLLK</u> <u>LVKLNIS</u> <u>RWDVSEES</u> <u>FP</u> <u>PLETLV</u> <u>IKKCID</u> <u>LEEIPLS</u> <u>F</u>			1200
333	<u>CFPQSEEWCLGDIT</u> <u>FHKLKLLK</u> <u>LVNLRIS</u> <u>RWDVSEES</u> <u>FP</u> <u>PLETLV</u> <u>IKRCVQ</u> <u>KEIPLS</u> <u>F</u>			1200
Hom1	<u>CFPQSEEWCLGDIT</u> <u>FHKLKLLK</u> <u>LVNLRIS</u> <u>RWDVSEES</u> <u>FP</u> <u>PLETLV</u> <u>IKRCVQ</u> <u>KEIPLS</u> <u>F</u>			1200
Hom2	<u>CFPQSEEWCLGDIT</u> <u>FHKLKLLK</u> <u>LVKLNIS</u> <u>RWDVSEES</u> <u>FP</u> <u>PLETLV</u> <u>IKKCID</u> <u>LEEIPLS</u> <u>F</u>			1200
	***** * * * * * * *			
	13	14		
Sw-5	<u>DIPT</u> <u>LEQIKLIG</u> <u>SWKVS</u> <u>LEDS</u> <u>SAVRMKEE</u> <u>EIKDTEG</u> <u>CDRLHLV</u> <u>KQRSD</u>			1246
MM	<u>DIPT</u> <u>LEQIKLVG</u> <u>SWKVS</u> <u>LEDS</u> <u>SAVRMKEE</u> <u>IIDIEG</u> <u>CDRLHLV</u> <u>QHSD</u>			1245
Sw5-a	<u>DIPT</u> <u>LEQIKLIG</u> <u>SWKVS</u> <u>LEDS</u> <u>SAVRMKEE</u> <u>EIKEIEG</u> <u>CDRLHLV</u> <u>QRYD</u>			1245
Sw5-b	<u>DIPT</u> <u>LEQIKLIG</u> <u>SWKVS</u> <u>LEDS</u> <u>SAVRMKEE</u> <u>EIKDTEG</u> <u>CDRLHLV</u> <u>KQRSD</u>			1246
333	<u>DIPT</u> <u>LEQIKLIG</u> <u>YWQVS</u> <u>LEDS</u> <u>SAVRMKEE</u> <u>EIKEIEG</u> <u>CDRLHLV</u> <u>KQR--</u>			1244
Hom1	<u>DIPT</u> <u>LEQIKLIG</u> <u>YWQVS</u> <u>LEDS</u> <u>SAVRMKEE</u> <u>EIKEIEG</u> <u>CDRLHLV</u> <u>KQR--</u>			1244
Hom2	<u>DIPT</u> <u>LEQIKLIG</u> <u>SWKVS</u> <u>LEDS</u> <u>SAVRMKEE</u> <u>EIKDTEG</u> <u>CDRLHLV</u> <u>KQRSD</u>			1246
	***** * * * * *			

Figura 7, continua.

3.3 Transferência das seqüências homólogas para o vetor binário pBI121

As seqüências homólogas obtidas a partir do acesso LA 371 foram transferidas para o vetor binário pBI121. Por meio da purificação dos plasmídeos recombinantes e clivagem com a enzima de restrição *HindIII* confirmou-se a presença dessas seqüências em pBI121 bem como a orientação delas no vetor (Figura 8). Os clones com seqüências nas orientações senso e anti-senso foram armazenados em glicerol 50% a -80°C

(Figura 9). Os clones com orientação senso foram transferidos para a estirpe LBA4404 de *A. tumefaciens* sendo a sua presença confirmada por PCR de colônias utilizando os oligonucleotídeos 1958B e FP12. Os clones positivos foram armazenados em glicerol 50% a -80°C para que posteriormente sejam utilizados na transformação de plantas visando à análise funcional dos homólogos clonados.

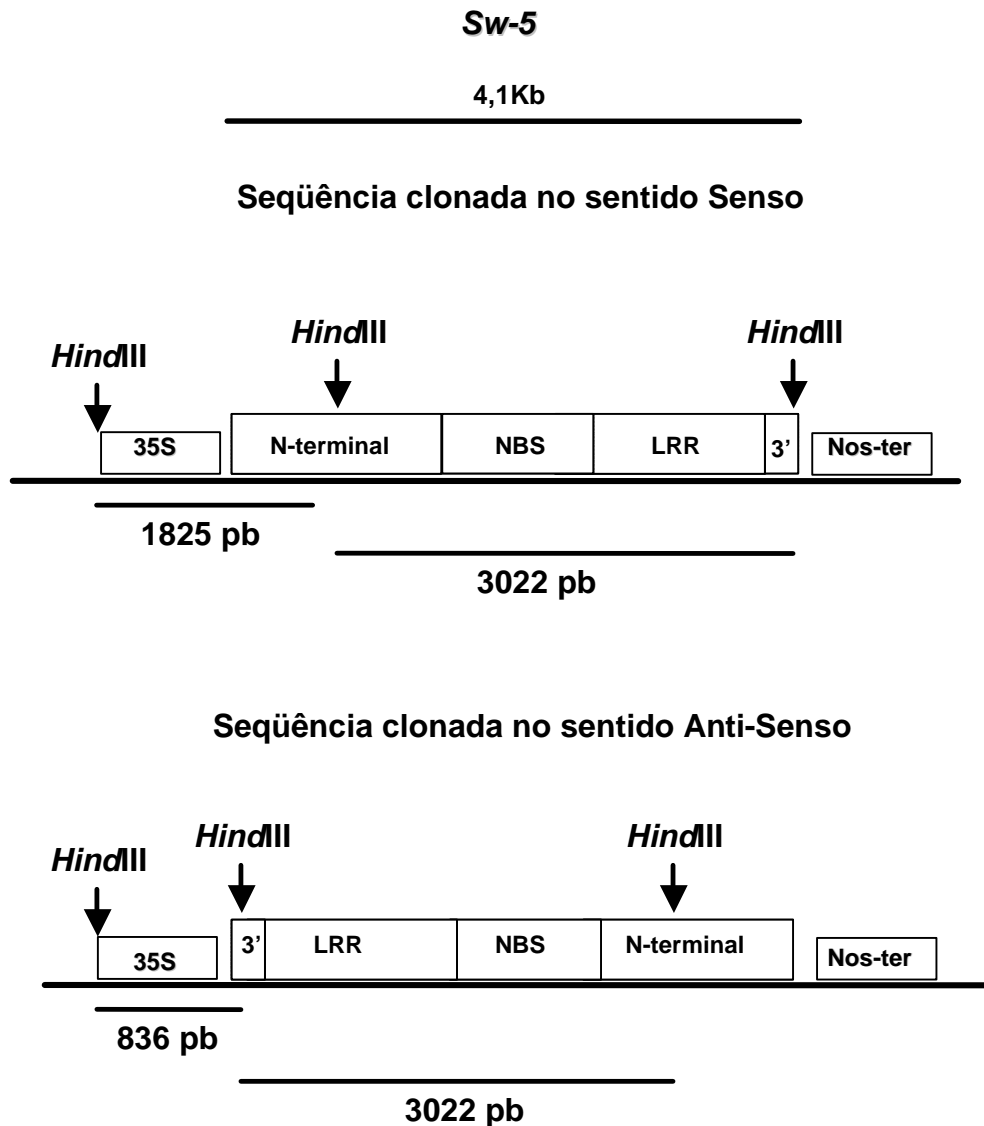


Figura 8 – Possíveis orientações das seqüências clonadas no vetor pBI121 inferidas com base no padrão de restrição com a enzima *HindIII* que possui sítios de restrição na porção do polilinker localizada posterior e próximo ao promotor 35S e na região N-terminal do gene *Sw-5*.

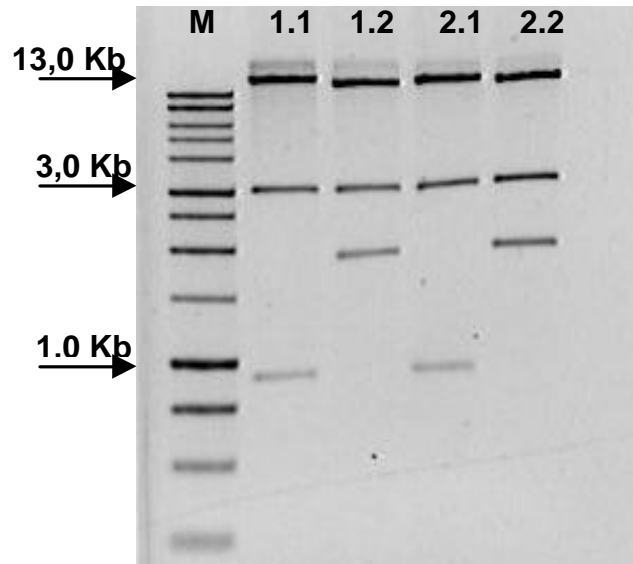


Figura 9 – Confirmação da clonagem e orientação dos homólogos 1 e 2 no vetor binário pBI121 (13Kb) por meio da clivagem com a enzima de restrição *Hind*III. As setas indicam os tamanhos dos fragmentos esperados nas diferentes orientações. **1.1** – homólogo 1 clonado no sentido anti-senso; **1.2** – homólogo 1 clonado no sentido senso; **2.1** – homólogo 2 clonado no sentido anti-senso; **2.2** – homólogo clonado no sentido senso. **M** – Padrão de comprimento de DNA “1Kb Ladder”.

4. DISCUSSÃO

Comprovando a hipótese levantada por LAU (2004) foram amplificados duas seqüências distintas a partir da planta resistente e homozigota (EP-1) derivada do acesso LA 371, empregando-se os oligonucleotídeos 1958B e 19Sma2 que se anelam no início da ORF e na região 3' não traduzida do gene *Sw-5*, respectivamente. Essas seqüências foram clonadas e caracterizadas por seqüenciamento sendo denominadas homólogo 1 e homólogo 2. O homólogo 1 codifica para uma proteína de 1244 aminoácidos e o homólogo 2, uma proteína de 1246 aminoácidos.

A comparação das seqüências revelou que o homólogo 1 é mais similar ao homólogo clonado por LAU (2004). Plantas de tabaco (*N. tabacum* 'Havana 425') e tomate (*L. esculentum* cv. Moneymaker) transformadas com este homólogo sob o controle do promotor 35S não apresentaram resistência a tospovírus (LAU, 2004). Esse resultado, conjuntamente com as análises de co-segregação entre os dois homólogos, em uma população segregante para resistência a tospovírus com marcadores CAPS ligados ao loco *Sw-5*, e a comparação das seqüências dos homólogos clonados com os obtidos por SPASSOVA *et al.* (2001) sugere que o homólogo 2 talvez seja responsável pela resistência do acesso LA 371 a tospovírus. A proteína codificada por esse homólogo, a proteína *Sw5-b* e a proteína *Sw-5* são mais similares entre si, do que com a proteína codificada pelo homólogo 1, a proteína *Sw5-a* e proteína codificada pela cultivar Moneymaker, reforçando ainda mais a hipótese de que o homólogo 2 seja responsável pela resistência a tospovírus presente no acesso LA 371. Esta hipótese estaria de acordo com os resultados obtidos por SPASSOVA *et al.* (2001) em que plantas de *N. tabacum* cv. SR1 transformadas com dois homólogos, *Sw5-a* e *Sw5-b*, que evidenciaram que somente o *Sw5-b* é necessário para a resistência a tospovírus presente na cultivar 'Stevens'.

Organização genômica similar também tem sido constatada para outros genes de resistência. MILLIGAN *et al.* (1998) seqüenciaram 52 Kb da região genômica do tomateiro resistente a *Meloidogyne* spp., onde se localiza o gene *Mi*. Por meio de comparações em banco de dados, esses autores identificaram nessa região dois genes com domínios característicos de genes de resistência, denominados *Mi-1.1* e *Mi-1.2*. Análise funcional destes dois genes demonstrou que somente o gene *Mi-1.2* é responsável pela resistência a *Meloidogyne* spp. (MILLIGAN *et al.*, 1998).

Estudos recentes têm demonstrado como a pressão de seleção pode atuar na formação dos genes *R* ou famílias de genes, bem como, na sua freqüência e distribuição nas populações (MEYERS *et al.*, 2005). A seleção natural tem grande influência nas moléculas elicitoras produzidas pelos patógenos, as quais são importantes no processo de infecção, bem como nos genes *R* do hospedeiro, importantes na defesa da planta (MEYERS *et al.*, 2005). Esses estudos têm tido um notável progresso na compreensão dos mecanismos de evolução dos genes *R* principalmente em *Arabidopsis* (RICHLY *et al.*, 2002; MONDRAGON-PALOMINO *et al.*, 2002; MEYERS *et al.*, 2003; BAUMGARTEN *et al.*, 2003). Como exemplo, pode-se citar o trabalho de MONDRAGON-PALOMINO *et al.* (2002) que comparou seqüências de subgrupos NBS-LRR de numerosos agrupamentos (*clusters*) ou famílias de genes *R* em *Arabidopsis* mostrando evidências de que a seleção atua positivamente na diversificação das seqüências LRR.

Estudos moleculares têm demonstrado que esses agrupamentos normalmente resultam da duplicação em tandem, duplicação segmental ou da duplicação individual ou de pequenos grupos de genes para locos distintos (duplicação ectópica) (RICHLY *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2002; MEYERS *et al.*, 2003; LEISTER, 2004) sendo observados em muitos locos de genes *R* (HULBERT *et al.*, 2001) distribuindo os domínios NBS-LRR no genoma (LEISTER, 2004). Os vários genes com domínios NBS-LRR codificados pelo genoma de *Arabidopsis* são encontrados em numerosos agrupamentos como conseqüência da duplicação em tandem resultante de *crossing-over* desigual (MEYERS *et al.*, 2003; BAUMGARTEN *et al.*, 2003). A análise do genoma de *Arabidopsis* também indica que numerosas duplicações em pequena escala do

genoma podem copiar ou translocar um ou vários genes *NBS-LRR* desses agrupamentos para locos distintos e ao acaso dentro do genoma (duplicação ectópica) (MEYERS *et al.*, 2003; BAUMGARTEN *et al.*, 2003; LEISTER, 2004). Entretanto, BAUMGARTEN *et al.* (2003) sugerem em seus trabalhos que a dispersão dos genes *NBS-LRR* em *Arabidopsis* originou-se principalmente da duplicação e translocação de segmentos cromossômicos inteiros (duplicação segmental) sendo sua ocorrência mais comum do que a duplicação ectópica.

Considerando a ORF completa dos homólogos clonados, a identidade ao nível de aminoácidos foi de 92,94%. Análises também foram realizadas considerando-se os domínios *NBS*, *LRR* e a extremidade amino, isoladamente. Como observado para outros genes *R* (NOEL *et al.*, 1999), o domínio *NBS* apresentou-se como o mais conservado, com a identidade variando de 97,51 a 100% dependendo das seqüências comparadas. A alta conservação do domínio *NBS* é esperada uma vez que esta região está envolvida na ligação a nucleotídeos trifosfatados (DANGL e JONES, 2001) e, portanto, sujeita a forte pressão de seleção. TAMELING *et al.* (2002) trabalhando com as proteínas *I-2* e *Mi-1* de tomate, similares à proteína *Sw-5*, demonstraram que estas proteínas possuem atividade de ATPase sendo capazes de hidrolisar e ligar a ATP e que esta atividade é essencial para a atividade das proteínas *I-2* e *Mi-1*.

A extremidade carboxi, região que compreende as *LRR*'s das proteínas deduzidas, é mais variável do que o domínio *NBS*. A identidade variou de 87,58% a 100%. Esta região tem sido apontada como a mais variável em muitas proteínas *R* (ELLIS *et al.*, 2000a). A menor conservação das *LRR*'s é atribuída ao fato de que esta região está envolvida no reconhecimento direto ou indireto da proteína elicitora do patógeno (DANGL e JONES, 2001). A troca de domínios entre alelos dos genes *L* e *P* do linho suporta a função das *LRR*'s como o principal determinante da especificidade de reconhecimento das proteínas *R* (ELLIS *et al.*, 1999; DODDS *et al.*, 2001). Assim, para poder acompanhar a variabilidade do patógeno, novas especificidades de resistência têm que ser geradas. Muitas vezes essas novas especificidades resultam de deleções ou substituições de aminoácidos nas *LRR*'s assim como alterações no número das repetições (ELLIS *et al.*, 2000b).

Os domínios LRR's dos homólogos clonados são constituídos por 14 repetições. Cada repetição apresenta o consenso LxxLxLxx, onde "x" representa um aminoácido qualquer e o "L" pode ser leucina, valina, isoleucina ou fenilalanina (KOBE e KAJAVA, 2001). Estudos cristalográficos com a proteína 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 a interação específica com o ligante (KOBE e DEISENHOFER, 1995; KOBE e KAJAVA, 2001). Esses fatos corroboram a maior variabilidade dos resíduos "x" em relação aos resíduos alifáticos observada para as proteínas R (ELLIS *et al.*, 1999). Os dados obtidos nesse trabalho concordam 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 homólogos. Esta variabilidade também sugere o envolvimento desta região na especificidade da resistência. Como exemplo da importância desta região na especificidade da resistência, LUCK *et al.* (2000) demonstraram que os alelos L6 e L7 que conferem resistência a duas raças de *Melampsora lini*, agente causal da ferrugem do linho, codificam proteínas idênticas nas regiões NBS e LRR, diferindo apenas em 11 resíduos de aminoácidos localizados na extremidade amino. Entretanto, ao contrário da proteína Sw-5, a proteína L apresenta na extremidade amino um domínio TIR ("Toll and Interleukin 1 receptor") e não um domínio CC (coiled-coil). Outro exemplo da importância da região N-terminal na especificidade da resistência foi demonstrada por HWANG *et al.* (2000) através de estudos com quimeras entre o gene *Mi-1* e genes parálogos que demonstraram a importância da interação da região terminal com a LRR no controle da reação de hipersensibilidade desencadeada pelo gene *Mi*.

A diversificação dos genes de resistência geralmente resulta da combinação de eventos como mutações pontuais, recombinação, inserção, deleção e eventos de duplicação (ELLIS *et al.*, 2000b; LEISTER, 2004). A comparação entre as seqüências homólogas clonadas revelou 82 substituições ao nível de aminoácidos ao longo de toda a ORF. A grande maioria destas substituições se concentra na extremidade amino (25) e nas LRR's (41).

Apesar de todas as evidências indicarem que o homólogo 2 é o gene responsável pela resistência de LA 371, somente a transformação de plantas de variedades de tomate e/ou tabaco suscetíveis com essa seqüência e a avaliação da resistência das plantas transgênicas obtidas poderá fornecer a comprovação definitiva desta hipótese. Para esta finalidade, os homólogos foram transferidos para o vetor binário pBI121, de forma que a expressão dos mesmos seja direcionada pelo promotor constitutivo 35S, e experimentos de transformação de tomate e tabaco encontram-se em andamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAMBURU, J. & MARTÍ, M. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. **Plant Pathology**, 52: 407, 2003.
- BAUMGARTEN, A.; CANNON, S.; SPANGLER, R.; MAY, G. Genome-level evolution of resistance genes in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, 165:309-319, 2003.
- BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Euphytica**, 71:151-154, 1993.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. **Molecular General Genetics**, 256:121-126, 1997.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; TANKSLEY, S.D.; FRARY, A.; FRARY, A.; OTONI, W.C.; CHEAVEGATTI, A. Positional cloning, molecular characterization and heterologous expression of the tospovirus resistance gene *Sw-5*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998. Edinburgh, Scotland. **Proceedings...** Edinburgh, 3:54, 1998.
- 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 Plant-Microbe Interaction**, 13:1130-1138, 2000.
- 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**, 431:367-378, 1996.
- COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; LOURENÇÃO, A.L.; MELO, A.M.T.; SIQUEIRA, W.J. Detecção do *Chrysanthemum stem necrosis virus* em tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, 26:252-254, 2000.
- DANGL, J.L. & JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, 411:826-833, 2001.

- DODDS, P.; LAWRENCE, G.; ELLIS, J. Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat β strand/ β turn motif determine the difference between the *P* and *P2* rust resistance specificities in flax. **The Plant Cell**, 13:163–178, 2001.
- ELLIS, J.G.; LAWRENCE, G.J.; LUCK, J.E.; DODDS, P.N. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. **The Plant Cell**, 11: 495–506, 1999.
- ELLIS, J.G.; DODDS, P.; PRYOR, T. The generation of plant resistance gene specificities. **Trends in Plant Science**, 5:373-379, 2000a.
- ELLIS, J.G.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, 3:278-284, 2000b.
- ERNST, K.; KUMAR, A.; KRISELEIT, D.; KLOOS, D.U.; PHILLIPS, M.S.; GANAL, M.W. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (*Hero*) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. **The Plant Journal**, 31:127–136, 2002.
- 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**, 22:413-418, 1997.
- FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, 13:207-209, 1995.
- GERMAN, T.L.; ULLMAN, D.E.; MOYER, J.W. *Tospoviruses*: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Annual Review of Phytopathology**, 30:315-348, 1992.
- GRANT, M. R.; GODIARD, L.; STRAUBE, E.; ASHFIELD, T.; LEWALD, J.; SATTLER, A.; INNES, R. W.; DANGL, J. L. Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. **Science**, 269: 843-846. 1995.
- GUIMARÃES, L.M.S. **Introgressão de resistência a tospovírus no tomateiro cultivado por meio de cruzamentos interespecíficos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 62p. Dissertação (Tese de Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- HULBERT, S.H.; WEBB, C.A.; SMITH, S.M.; SUN, Q. Resistance gene complexes: evolution and utilization. **Annual Review of Phytopathology**, 39:285–312, 2001.
- HWANG, C.F.; BHAKTA, A.V.; TRUESDELL, G.M.; PUDLO, W.M.; WILLIAMSON, V.M. Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. **The Plant Cell**, 12:1319–1329, 2000.

- KOBE, B. & DEISENHOFER, J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. **Nature**, 374:183-186, 1995.
- KOBE, B. & KAJAVA, A.V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Current Opinion in Structural Biology**, 11:725–732, 2001.
- KRISHNA-KUMAR, N.K.; ULLMAN, D.E.; CHO, J.J. Evaluation of *Lycopersicon* germ plasm for tomato spotted wilt tospovirus resistance by mechanical inoculation and thrips transmission. **Plant Disease**, 77:938-941, 1993.
- LATHAM, L.J. & JONES, R.A.C. Selection of resistance breaking strains of tomato spotted wilt tospovirus. **Annals of Applied Biology**, 133: 385-402, 1998.
- LAU, D. **Análise de fatores que influenciam a resistência a tospovírus conferida pelo gene Sw5 em tomateiro e tabaco**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 84p. Dissertação (Tese de Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LAU, D. **Análise Molecular da Interação entre Tospovírus e o gene de resistência Sw-5**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 101p. Dissertação (Tese de Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- LEISTER, D. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. **TRENDS in Genetics**, 20-3: 116-122, 2004.
- LIMA, G.S.A. **Resistência a tospovírus, clonagem e caracterização molecular de alelos do loco Sw-5 em espécies de *Lycopersicon***. Viçosa, MG: UFV, 2001. 91p. Dissertação (Tese de Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- LIMA, G.S.A.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; VENTURA, G.M. Resistência de amplo espectro a tospovírus em acessos de *Lycopersicon peruvianum* e *L. chilense*. **Summa Phytopathologica**, 29: 352-354, 2003.
- LOURENÇÃO, A.L.; SIQUEIRA, W.J.; MELO, A.M.T.; MELO, P.C.T.; COLARICCIO, A.; FONTE, L.C.; CHAVES, A.L.R. Avaliação da resistência a tospovírus em cultivares e linhagens de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, 27:17-23, 2001.
- LUCK, J.E.; LAWRENCE, G.J.; DODDS, P.N.; SHEPHERD, K.W.; ELLIS, J.G. Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. **The Plant Cell**, 12:1367–1377, 2000.
- MARTIN, G.B.; BOGDANOVA, A.J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 54:23–61, 2003.
- MEYERS, B.C.; KOZIK, A.; GRIEGO, A.; KUANG, H.; MICHELMORE, R.W. Genome-wide analysis of NBS-LRR–encoding genes in Arabidopsis. **The Plant Cell**, 15: 809–834, 2003.

- MEYERS, B. C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R.S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, 8:128–134, 2005.
- MILLIGAN, S.B.; BODEAU, J.; YAGHOobi, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P.; WILLIAMSON, V.M. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **The Plant Cell**, 10:1307-1319, 1998.
- MONDRAGON-PALOMINO, M.; MEYERS, B.C.; MICHELMORE, R.W.; GAUT, B.S. Patterns of positive selection in the complete NBS-LRR gene family of *Arabidopsis thaliana*. **Genome Research**, 12:1305-1315, 2002.
- 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*. **The Plant Cell**, 11:2029-2112, 1999.
- ORI, N.; ESHED, Y.; PARAN, I.; PRESTING, G.; AVIV, D.; TANKSLEY, S.; ZAMIR, D.; FLUHR, R. The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, lucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. **The Plant Cell** 9:521-532, 1997.
- PATERSON, R.G.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. **Euphytica**, 43:173-178, 1989.
- 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**, 4:95-148, 1996.
- RICHLY, E.; KURTH, J.; LEISTER, D. Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. **Mol. Biol. Evol.**, 19:76-84, 2002.
- ROSELLÓ, S.; DIEZ, M. J.; NUEZ, F. Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. **European Journal of Plant Pathology**, 104:499-509, 1998.
- ROSSI, M.; GOGGIN, F.L.; MILLIGAN, S.B.; KALOSHIAN, I.; ULLMAN, D.E.; WILLIAMSON, V.M. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:9750–54,1998.
- SALMERON, J.M.; OLDROYD, G.E.D.; ROMMENS, C.M.T.; SCOFIELD, S.R.; KIM, H.S.; LAVELLE, D.T.; DAHLBECK, D.; STASKAWICZ, B.J. Tomato *Prf* is a member of the Leucine-Rich Repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. **Cell**, 86:123–133, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

- SPASSOVA, M.I.; PRINS, T.W.; FOLKERTSMA, R.T.; KLEIN-LANKHORST, R.M.; HILLE, J.; GOLDBACH, R.W.; PRINS, M. The tomato gene *Sw5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. **Molecular Breeding**, 7:151–161, 2001.
- STEVENS, M.R.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Inheritance of gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, v.59, p.9-17, 1992.
- TAMELING, W.I.L.; ELZINGA, S.D.J.; DARMIN, P.S.; VOSSEN, J.H.; FRANK L. W. TAKKEN, F.L.W.; HARING, M.A.; CORNELISSEN, B.J.C. The tomato *R* gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. **The Plant Cell**, 14: 2929–2939, 2002.
- TORNERO, P.; CHAO, R.A.; LUTHIN, W.N.; GOFF, S.A.; DANGL, J.L. Large-scale structure-function analysis of the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. **The Plant Cell**, 14, 435–450, 2002.
- VOS, P.; SIMONS, G.; JESSÉ, T.; WIJBRANDI, J.; HEINEN, L.; HOGERS, R.; FRIJTERS, A.; GROENENDIJK, J.; DIERGAARDE, P.; REIJANS, M.; FIERENS-ONSTENK, J.; De BOTH, M.; PELEMAN, J.; LIHARSKA, T.; HONTELEZ, J.; ZABEAU, M. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature Biotechnol**, 16:1365–1369, 1998.
- ZHU, H.; CANNON, S.B.; YOUNG, N.D.; COOK, D.R. Phylogeny and genomic organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. **Mol Plant Microbe Interact**, 15:529-539, 2002.