

RENATA MARIA DE OLIVEIRA

**ANÁLISES DA RESISTÊNCIA GENÉTICA À *Tospovirus* E *Potyvirus* EM
ACESSOS DE *Solanum* (SECÇÃO *Lycopersicon*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Fitossanidade.

Orientador:

Prof. Dr. Érico de Campos Dianese

Coorientador:

Prof. PhD. Marcos Gomes da Cunha

Goiânia, GO – Brasil
2014

RENATA MARIA DE OLIVEIRA

**TÍTULO: ANÁLISES DA RESISTÊNCIA GENÉTICA À *Tospovirus* E *Potyvirus* EM
ACESSOS DE *Solanum* (SECCÃO *Lycopersicon*)**

Dissertação DEFENDIDA E APROVADA em 27 de fevereiro de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr^a. Rita de Cássia Pereira Carvalho
Universidade de Brasília - UnB

Prof. PhD. Evandro Novaes
EA/UFG

Prof. Dr. Érico de Campos Dianese
Orientador – EA/UFG

Goiânia, Goiás
Brasil

À Maria Antônia (*in memoriam*) e Celia Maria,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Celia e Orozino, pelo amor incondicional e dedicação durante a minha jornada.

Aos meus irmãos, Thiago, Ricardo, Fernanda e Felipe, pela amizade e apoio.

Aos meus amigos, pela compreensão e crédito.

Aos colegas de laboratório, pelo incentivo e auxílio.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Érico de Campos Dianese, pela paciência, sabedoria partilhada e disposição para me orientar.

Aos pesquisadores Leonardo Silva Boiteux, Maria Esther N. F. Boiteux e Mirtes Freitas Lima pelo apoio e ensinamentos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO GERAL.....	10
GENERAL ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 A CULTURA DO TOMATEIRO.....	17
2.2 <i>Tospovirus</i>	19
2.3 <i>Potyvirus</i>	21
2.4 RESISTÊNCIA GENÉTICA A <i>Tospovirus</i> e <i>Potyvirus</i>	24
2.4.1 Resistência dominante à <i>Tospovirus</i>.....	26
2.4.2 Resistência recessiva à <i>Potyvirus</i>.....	27
2.5 MARCADORES MOLECULARES.....	29
2.6 EVOLUÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E A ESTABILIDADE DO GENE <i>Sw-5</i>	32
3 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A <i>TOSPOVIRUS</i> EM ACESSOS DE <i>SOLANUM</i> (SECÇÃO <i>LYCOPERSICON</i>).....	36
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37
3.1 INTRODUÇÃO.....	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.2.1 Material vegetal e ensaios em casa de vegetação.....	40
3.2.2 Extração de dna e ciclos PCR.....	41
3.2.3 Sequenciamento e análise do material selvagem resistente para análise evolutiva do gene <i>Sw-5</i>.....	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.4 CONCLUSÃO.....	51
4 CONFIRMAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A <i>POTATO VIRUS Y</i> E <i>PEPPER YELLOW MOSAIC VIRUS</i> EM ACESSOS DE ESPÉCIES SELVAGENS DE <i>SOLANUM</i> (SECÇÃO <i>LYCOPERSICON</i>).....	53
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	53
4.1 INTRODUÇÃO.....	54
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.2.1 Obtenção do isolado e seleção do material vegetal.....	56
4.2.2 Manutenção, preparo do inóculo e inoculação dos acessos.....	57
4.2.3 Confirmação da infecção a PVY via DOT-BLOT.....	57
4.2.4 Extração de rna, e identificação da resistência múltipla a PepYMV e PVY por RT-PCR.....	58
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58

4.4	CONCLUSÃO.....	64
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
6	REFERÊNCIAS.....	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação de acessos de *Solanum* (Secção *Lycopersicon*) pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças. (Adaptada de Dianese et al., 2009).....45
- Tabela 2.** Acessos CNPH avaliados via DOT-BLOT para resistência a *Potato virus Y* após inoculação mecânica com um isolado deste vírus.....60
- Tabela 3.** Acessos CNPH avaliados via DOT-BLOT para resistência a *Pepper yellow mosaic virus*.....61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Partícula de um tospovírus. A membrana lipídica contém as glicoproteínas (Gn e Gc). As três estruturas localizadas na parte interna correspondem às ribonucleoproteínas (RNPs), formadas por RNA viral encapsidado pela proteína N e a polimerase (L) (adaptada de Hogenhout *et al.*, 2008).....20
- Figura 2.** Partícula de *Potyvirus* de 720-850 nm de comprimento e 12-15 nm de diâmetro. (Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html).....22
- Figura 3.** Perfil de amplificação do DNA genômico dos acessos de tomateiro pertencente ao grupo ‘CVR Plant Breeding’. M = marcador 50 pb (Invitrogen); V = ‘Viradoro’; K = ‘Santa Cruz Kada’; C- = controle negativo com água; 1 = ‘PI-1123001’; 2 = ‘PI-1123002’; 3 = ‘PI-1123003’; 4 = ‘PI-1123004’; 5 = ‘PI-1123005’; 6 = ‘PI-1123006’; 7 = ‘PI-1123007’; 8 = ‘PI-1123008’; 9 = ‘PI-1123009’; 10 = ‘PI-1123010’; 11 = ‘PI-1123011’; 12 = ‘PI-1123012’; 13 = ‘PI-1123013’; 14 = ‘PI-1123014’; 15 = ‘PI-1123015’; 16 = ‘PI-1123016’; 17 = ‘PI-1123017’; 18 = ‘PI-1123018’; 19 = ‘PI-1123019’; 20 = ‘PI-1123020’; 21 = ‘PI-1123021’; 22 = ‘PI-1123022’; 23 = ‘PI-1123023’; 24 = ‘PI-1123024’; 25 = ‘PI-1123025’; 26 = ‘PI-1123026’; 27 = ‘PI-1123027’; 28 = ‘PI-1123028’; 29 = ‘PI-1623001’; 30 = ‘PI-1623002’; 31 = ‘PI-1623003’; 32 = ‘PI-1623004’; 33 = ‘PI-1623005’; 34 = ‘PI-1623006’; 35 = ‘PI-1623007’; 36 = ‘PI-1623008’; 37 = ‘PI-1623009’; 38 = ‘PI-1623011’; 39 = ‘PI-1623012’; 40 = ‘PI-1623013’; 41 = ‘PI-1623014’; 42 = ‘PI-1623015’; 43 = ‘PI-1623016’; 44 = ‘PI-1623017’; 45 = ‘PI-1623018’; 46 = ‘PI-1623019’; 47 = ‘PI-1623020’; 48 = ‘PI-1623021’; 49 = ‘PI-1623022’; 50 = ‘PI-1623023’; 51 = ‘PI-1623024’; 52 = ‘PI-1623025’; 53 = ‘PI-1623026’; 54 = ‘PI-890213071’; 55 = ‘PI-890783091’; 56 = ‘PI-890783081’; 57 = ‘PI-890093531’; 58 = ‘PI-890533072’; 59 = ‘PI-890093073’; 60 = ‘PI-16230261’; 61 = ‘PI-1623028’; 62 = ‘PI-1623029’.....44
- Figura 4.** Perfil de amplificação do DNA genômico dos acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças. M = marcador 50 pb (Invitrogen); V = ‘Viradoro’; T = ‘Tospodoro’; K = ‘Santa Cruz Kada’; 1 = ‘CNPH 101’ espécie *S. peruvianum*; 2 = ‘CNPH 410’ espécie *S. chilense*; 3 = ‘CNPH 421’ espécie *S. habrochaites*; 4 = ‘CNPH 457’ espécie *S. lycopersicum*; 5 = ‘CNPH 786’ espécie *S. peruvianum*; 6 = ‘CNPH 933’ espécie *S. peruvianum*; 7 = ‘CNPH 936’ espécie *S. peruvianum* var. *dentatum*; 8 = ‘CNPH 938’ espécie *S. corneliomuelleri*; 9 = ‘CNPH 939’ espécie *S. corneliomuelleri*; 10 = ‘CNPH 1194’ espécie *S. peruvianum*.....45
- Figura 5.** Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos acessos CNPH em relação a sequência base (Stevens). Stevens: Sequência do gene *Sw-5* código NCBI AY007366.1; Viradoro: Acesso comercial resistente à tospovírus da espécie *S. lycopersicum*; Tospodoro: Acesso comercial resistente à tospovírus da espécie *S. lycopersicum*; 101: acesso CNPH espécie *S. peruvianum*; 410:

acesso CNPH espécie *S. chilense*; 421: acesso CNPH espécie *S. habrochaites*; 457: acesso CNPH espécie *S. lycopersicum*; 786: acesso CNPH espécie *S. peruvianum*; 933: acesso CNPH espécie *S. peruvianum*; 936: acesso CNPH espécie *S. peruvianum* var. *dentatum*; 938: acesso CNPH espécie *S. corneliomuelleri*; 939: acesso CNPH espécie *S. corneliomuelleri*; 1194: acesso CNPH espécie *S. peruvianum*.....47

Figura 6. Árvore Filogenética predita pelo alinhamento múltiplo através de Neighbor-joining (Mega 6.06).....50

Figura 7. Perfil de amplificação do cDNA dos acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças inoculados com espécies do gênero *Potyvirus* visualizados em gel de agarose 1,5%. M = marcador 1 kb (Invitrogen); 1 = *Datura sp.* inoculada com PVY; 2 = CNPH '798' inoculado com PVY; 3 = CNPH '1121' inoculado com PVY; 4 = CNPH '1122' inoculado com PVY; 5 = CNPH '1288' inoculado com PVY; 6 = *Capsicum sp.* inoculada com PepYMV; 7 = *Physalis sp.* inoculada com PepYMV; 8 = CNPH '0798' inoculado com PepYMV; 9 = CNPH '1121' inoculado com PepYMV; 10 = CNPH '1122' inoculado com PepYMV; 11 = CNPH '1288' inoculado com PepYMV; 12 = Tomate Santa Clara não inoculado; 13 = Controle negativo da reação do cDNA; 14 = Controle negativo da reação do cDNA; 15 = Controle negativo da reação de PCR.....62

RESUMO GERAL

Oliveira, R. M. **Análises da resistência genética à *tospovirus* e *potyvirus* em acessos de *Solanum* (secção *lycopersicon*)**. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitossanidade) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014¹.

O tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo, e isso constitui um fator importante para a sua vulnerabilidade ao ataque de pragas e doenças, que contribuem para a diminuição da produção na cultura e afeta a qualidade do fruto. Dentre as doenças na cultura do tomateiro, destacam-se as de etiologia viral, que apresentam maior dificuldade de controle, sobressaindo àquelas causadas por espécies do gênero *Tospovirus* e *Potyvirus*, que podem causar perdas de até 100% na cultura. Os tospovírus são responsáveis pela doença conhecida como ‘vira-cabeça do tomateiro’, e são transmitidos por espécies de trips. No Brasil há a ocorrência de quatro espécies de tospovírus afetando tomateiros: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), sendo a GRSV a espécie de maior incidência. O primeiro gene de resistência a TSWV identificado foi o *Sw-5*, que é eficiente contra todas as espécies de tospovírus que infectam o tomateiro, sendo amplamente utilizado em programas de melhoramento por este motivo e por ser um gene de resistência com característica dominante. Fontes de resistência foram encontradas em outros acessos selvagens de *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium*, *S. corneliomuelleri* e *S. lycopersicum*, sendo estas espécies fontes promissoras de resistência para serem utilizados em programas de melhoramento. Visando identificar em acessos selvagens do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças fontes potenciais de resistência a tospovirose, e a partir da análise evolutiva do gene *Sw-5* através da filogenia de acessos selvagens, agrupando-os em grupos evolucionários, executou-se o presente trabalho. A análise evolucionária apresentou espécies de tomateiros diferentes que conferem resistência ampla às espécies de tospovírus e possuem o gene *Sw-5*, se enquadrando em grupos evolucionários distintos. Os acessos selvagens das espécies *S. chilense* e *S. habrochaites* que apresentaram padrão de bandas compatível com a resistência podem fornecer alelos diferenciados da fonte de resistência baseada em *S. peruvianum*, já que se agruparam em outros ramos da árvore filogenética, com potencial para contribuir com a manutenção da resistência conferida por *Sw-5*. As espécies de *Potyvirus*, *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), tem sido relatadas causando danos severos (qualitativos e quantitativos) à produção de tomate para seus diversos fins. Plantas sintomáticas apresentam clareamento de nervuras, mosqueado e deformação foliar quando infectadas por PVY; e pontos necróticos que podem evoluir até a morte da planta quando infectada por PepYMV. Devido a característica de resistência recessiva a *Potyvirus*, a busca por novas espécies que confirmem resistência genética a potyvirose de ocorrência na cultura do tomateiro é importante. O gene *pot-1*, que confere um padrão de resistência recessiva a potyvirose no tomateiro, tem seu mecanismo regido pela restrição do movimento célula-a-célula da proteína do capsídeo, que impede o acúmulo viral nos tecidos. Fontes de resistência tem sido relatadas em espécies silvestres de *Solanum*, em *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites*, mas se faz necessário avaliar a herança da resistência, já que a resistência relatada é conferida por um gene recessivo monogênico. O presente trabalho teve por objetivo confirmar em acessos selvagens do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças espécies que confirmem resistência múltipla a PVY e PepYMV, tornando-as potenciais candidatas a fontes de

resistência para serem utilizadas em programas de melhoramento. Espécies selvagens do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças foram avaliadas para resistência a PVY e PepYMV e identificou-se em acessos das espécies *S. habrochaites* e *S. peruvianum* via análise sorológica (DOT-BLOT) possíveis fontes de resistência.

Palavras-chave: Sw-5, fontes de resistência, PVY, PepYMV, resistência múltipla.

¹Orientador: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA-UFG.

ABSTRACT GENERAL

Oliveira, R. M. **Genetic analysis of resistance to *tosspovirus* and *potyvirus* in access of *Solanum* (section *lycopersicon*)**. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitossanidade) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014¹.

Tomato is one of the most cultivated vegetables worldwide, and this is an important factor in their vulnerability to attack by pests and diseases, which contribute to the decrease in production and affects the quality of the fruit. Among diseases affecting tomato production, the ones caused by viruses are of the utmost importance, which are more difficult to control, highlighting those caused by species of the genus *Tospovirus*, which can cause losses of up to 100 %. The tospoviruses are responsible for the disease known as 'tomato spotted wilt' and are transmitted by thrips. In Brazil, four species of tospoviruses occur in tomato: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) and *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), with a greater incidence of GRSV. The first TSWV resistance gene identified was the *Sw-5*, which is effective against all species of tospoviruses infecting tomato and is widely used in breeding programs for this reason, because the resistance gene presents a dominant trait. Sources of resistance were found in other wild accessions of the species *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium*, *S. corneliomuelleri* and *S. lycopersicum*, showing promising results as sources of resistance for use in breeding programs. To identify a source of tospovirus resistance in wild accessions of the Germplasm Bank of Embrapa Hortaliças, and to perform the evolutionary analysis of the *Sw-5* gene through the phylogeny of wild accessions, grouping them into evolutionary groups, this work was realized. The wild accessions of *S. chilense* and *S. habrochaites* species that showed compatible type of bands with resistance, can provide differentiated alleles of the resistance source based in *S. peruvianum*, since they grouped in other branches of the phylogenetic tree, with the potential to contribute with maintenance of resistance conferred by SW-5. The species of *Potyvirus*, *Potato virus Y* (PVY) and *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), have been reported causing severe damage (qualitative and quantitative) to the production of tomatoes for their various purposes. Symptomatic plants have whitening ribs, mottling and leaf distortion when infected by PVY, and necrotic spots that may progress to death of the plant when infected by PepYMV. Because of the recessive characteristic of the typical resistance to potyvirus, the search for new species that confer genetic resistance to this genus occurring in tomato is important. The *pot-1* gene, which confers resistance to potyviroses in tomato is governed by a restriction mechanism of cell-to-cell movement of the capsid protein, which prevents viral accumulation in tissues. Sources of resistance have been reported in wild *Solanum* species in *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. pimpinellifolium* and *S. habrochaites*, but it is necessary to evaluate the inheritance of this resistance, since the reported resistance is conferred by a monogenic recessive gene. This study aimed to identify in wild species accessions of the Germplasm Bank of Embrapa Hortaliças conferring multiple resistance to PVY and PepYMV, making them candidates for potential sources of resistance for use in breeding programs. Species wild the Germplasm Bank of Embrapa Hortaliças were evaluated for resistance to PVY and PepYMV and identified in accessions of the species *S. peruvianum* and *S. habrochaites* via serological analysis (DOT-BLOT) possible sources of resistance.

Key words: *Sw-5*, sources of resistance, PVY, PepYMV, multiple resistance.

¹Adviser: Prof. Dr. Érico de Campos Dianese. EA-UFG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo, sendo consumido em suas diferentes formas, processado ou “in natura”. O tomate é originário da região Andina, que corresponde ao norte do Chile até o Equador, e ilhas Galápagos. Foi introduzido na Espanha, a partir do México, no século XVI, sendo que no século XVIII já era largamente consumido em vários países europeus (Giordano & Ribeiro, 2000).

O tomateiro é uma dentre muitas espécies autógamas cultivadas, que tiveram sua diversidade genética reduzida drasticamente; primeiro, devido à sua domesticação fora do centro de origem e, segundo, pelo melhoramento de plantas, que foi sendo feito ao longo dos anos com base em um número limitado de genótipos, cujas sementes foram coletadas pelos descobridores da América e levadas ao continente Europeu. Além disso, muitos genótipos foram perdidos ao longo do tempo, em consequência da substituição ou do desaparecimento de espécies silvestres, cultivares obsoletas e de variedades locais (Saavedra et al., 2001). Conseqüentemente, observa-se um alto grau de uniformidade nas variedades, tornando a cultura altamente vulnerável a pragas e doenças (Carelli, 2003).

O cultivo ininterrupto favorece o ataque de patógenos e o aparecimento de diversas doenças, que contribuem para a diminuição da produção na cultura do tomateiro e afetam a qualidade do fruto. Essas doenças são causadas por diversos patógenos, como *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., sendo as de origem viral que apresentam maiores dificuldades de controle. Dentre as doenças viróticas, destacam-se as causadas por espécies de vírus dos gêneros *Tospovirus* (*Groundnut ringspot virus*) e *Begomovirus* (*Tomato golden mosaic virus*) (Kurozawa & Pavan, 2005), mas o tomateiro é também afetado por espécies pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* (Lopes, 2005) e também por espécies do gênero *Crinivirus* (Barbosa et al., 2010).

Os tospovírus (família *Bunyaviridae*) são responsáveis pela doença conhecida como “vira-cabeça-do-tomateiro” que causa perdas anuais em cultivos de tomates de mesa e para processamento (de Ávila, 1993). Esses vírus são transmitidos por tripes de maneira circulativa/propagativa (Wijkamp et al., 1993). Espécies desse gênero possuem distribuição

mundial e apresentam grande diversidade de espécies virais infectando uma vasta gama de hospedeiros. O *Groundnut ringspot virus* (GRSV) é a espécie de tospovírus prevalente em plantios de tomate no Brasil. As plantas suscetíveis geralmente apresentam sintomas de bronzeamento e/ou manchas em anéis cloróticos nas folhas, necrose de pecíolos, anéis necróticos em frutos e necrose generalizada (Lopes & de Ávila, 2005).

Devido às dificuldades encontradas no combate ao inseto vetor, como características de polifagia, facilidade de reprodução, número de ovos produzidos e capacidade de difusão rápida na natureza, o desenvolvimento de cultivares de tomate com resistência a virose é o melhor método para o controle da doença (Colariccio et al., 2001). A seleção de plantas resistentes é feita através do processo de transferência de alelos de resistência ou por meio de marcadores moleculares, que levam a resultados mais rápidos, além de não depender de condições ambientais e do estágio de desenvolvimento da planta para realizar a seleção (Nogueira, 2005; Nogueira et al., 2007).

O primeiro gene de resistência a TSWV identificado em tomateiro foi o *Sw-5*, que confere resistência de amplo espectro ao TSWV, GRSV, TCSV e CSNV. Esse gene foi incorporado a *S. lycopersicum* a partir de acessos de *S. peruvianum* (Stevens et al. 1992; Thompson & Zijl 1996). Vários estudos demonstraram que a resistência mediada por *Sw-5* é eficiente contra as espécies de *Tospovirus* que infectam o tomateiro e devido ao caráter não específico dessa resistência, esse gene tornou-se o mais utilizado em programas de melhoramento (Ávila 1993; Boiteux & Giordano 1993; Roselló et al. 1999).

Dentre os vírus de planta que acometem a cultura do tomateiro, que também merece destaque e é preferencialmente controlado por resistência genética, é o gênero *Potyvirus*. Este gênero é considerado um dos maiores e mais importantes gêneros de vírus de plantas, com 20% das espécies conhecidas, apresentando 146 espécies descritas (Hull, 2002; Fauquet et al., 2005; ICTV, 2014) e são capazes de infectar mais de 2.000 espécies de plantas (Berger et al., 2005). O *Potato virus Y* (PVY) é a espécie tipo do gênero *Potyvirus* e várias estirpes deste vírus já foram identificadas (Glais et al., 2002). Segundo Janzac et al. (2008b), o PVY é o único potyvirus com distribuição mundial, sendo outras espécies restritas a continentes e/ou países.

No Brasil, o PVY foi observado primeiramente em plantações de batata na década de 40 (Nóbrega & Silberschmidt, 1944) e em pimentão na década de 50 (Costa & Alves, 1950). No início da década de 70, a introdução de cultivares resistentes causou a diminuição da importância deste vírus, apesar dessa resistência ser quebrada com frequência

por novos isolados (Nagai, 1983). O uso intenso dessas cultivares levou a seleção e emergência de isolados virulentos considerados variantes de PVY capazes de suplantar esta resistência, como o PVY^m, no início da década de 90. Essa estirpe, denominada dessa forma por infectar pimentões da cultivar ‘Magda’, emergiu como nova ameaça a plantios que apresentavam resistência a PVY (Nagai, 1993). Análises baseadas em ELISA direto, do genoma correspondente à região 3’ UTR e da capa protéica, permitiram caracterizar este isolado como sendo uma nova espécie de potyvírus por apresentar baixa relação filogenética com isolados típicos de PVY. Essa nova espécie, denominada *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Inoue-Nagata et al., 2002), foi identificada também afetando cultivos de tomate causando perdas de até 100%, como relatado em regiões produtoras do Espírito Santo, mais especificamente em plantios da cultivar Alambra (de Ávila et al, 2004; Maciel- Zambolim et al., 2004).

Existem diferenças biológicas e genômicas entre isolados de PepYMV de pimentão e de tomate, que vão desde a gama de hospedeiros até intensidade de sintomas e variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos do gene da capa protéica (Cunha et al., 2004). Para se diferenciar isolados de PVY e PepYMV, recomenda-se o uso de uma planta indicadora de sintomas (*Datura metel*). Essa indicadora apresentará clareamento de nervuras, mosqueado e deformação foliar quando infectada por PVY; e pontos necróticos que podem evoluir até a morte da planta quando infectada por PepYMV (Inoue-Nagata & Resende, 2008).

O presente trabalho tem o objetivo de identificar novos acessos de tomateiro de com resistência a tospovírus advindos do Banco de Germoplasma da CVR Plant Breeding e Embrapa Hortaliças, e realizar um estudo de análise evolutiva do gene *Sw-5*, propondo hipóteses para a diversidade e evolução do mesmo, bem como revelar acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças que possuam resistência múltipla às espécies de potyvírus (Potato virus yellow - PVY e Pepper yellow mosaic virus - PepYMV).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO TOMATEIRO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) está entre as hortaliças mais consumidas no mundo, nas diferentes formas, processadas ou “in natura”. Tem como seu centro de origem a região Andina, na América do Sul, compreendendo um estreito território, limitado ao sul pelo norte do Chile, ao norte pelo Equador e sul da Colômbia, ao leste pela Cordilheira dos Andes e a oeste pelo Oceano Pacífico, incluindo o Arquipélago das Ilhas Galápagos (Rick, 1982).

Há controvérsias sobre a sua domesticação, e a hipótese mais aceita é que o tomate-cereja (*S. lycopersicum*), foi levado pelos povos Incas até a região do sul do México, onde habitavam os Astecas, que tornaram o país o centro de domesticação do tomate cultivado, em especial, na região de Puebla e Vera Cruz. No México, a espécie teria sido domesticada e levada para a Europa pelos colonizadores nos séculos XVI e XVII (Jenkins, 1948).

Uma segunda hipótese de domesticação foi formulada por Rick e Holle (1990), de que centros independentes de domesticação podem ter ocorrido ao mesmo tempo no México e na região Andina. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que *S. Lycopersicum* cresce espontaneamente em muitos locais da América do Sul, estando amplamente disseminado em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde poderiam ter sido introduzidas acidentalmente ou por cultivo (Rick, 1991).

O tomate pertence a uma família botânica extremamente diversa e grande, que é a *Solanaceae*, a qual inclui outras espécies de importância agrônômica, como a berinjela, o pimentão, a petúnia, o fumo e a batata (Minami & Haag, 1980). O gênero *Solanum* possui uma grande variabilidade, possibilitando o desenvolvimento de cultivares para atender as mais diversas demandas do mercado para processamento e para consumo “in natura” (Silva & Giordano, 2000).

O tomate só foi agrupado no gênero *Solanum* após vários debates entre taxonomistas. Linnaeus, em 1753, considerou o tomate pertencente ao gênero *Solanum* e descreveu três espécies (*S. lycopersicum*, *S. peruvianum* e *S. pimpinellifolium*), baseado na

característica multi-ocular dos frutos. Por outro lado, Miller (1754) reconsiderou essa classificação e alocou o tomate ao gênero *Lycopersicon*. A classificação dos tomates dentro do gênero *Lycopersicon* foi mantida por vários botânicos (modernos e clássicos) e melhoristas, mas nem sempre essa informação foi unânime. Diversos taxonomistas reconheciam que os tomates estavam classificados dentro do gênero *Solanum* e não no então segregado gênero *Lycopersicon* (Fosberg, 1987; Child, 1990). Muller (1940) e Luckwill (1943) classificaram o tomate com base em critérios morfológicos, enquanto Rick (1990) o classificou baseado no seu tipo de cruzamento (autocompatíveis e autoincompatíveis). Posteriormente Peralta & Spooner (2001) e Peralta et al. (2005), fizeram análises de características morfológicas e moleculares através de sequenciamento genético, chegando então à conclusões que levaram ao reagrupamento do tomate ao gênero *Solanum*, subdividindo-o em várias espécies, cujas características adaptativas proporcionaram sua distribuição pelo mundo se tornando uma das principais hortaliças produzidas atualmente.

O ataque de fitopatógenos é um dos fatores que mais contribuem para a diminuição da produção dessa importante cultura. Mais de 30 viroses podem infectar o tomateiro, dentre os gêneros *Tospovirus*, *Begomovirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus*, sendo algumas delas transmitidas por nematóides (gênero *Xiphinema*), outras por insetos vetores (gênero *Frankliniella*, *Trips*, *Bemisia*) e ainda outras mecanicamente (Jones, 1991).

Dentre as fitoviroses que se manifestam em hortaliças no Brasil, os tospovírus destacam-se como uma das mais importantes, podendo infectar diversas espécies olerícolas, principalmente solanáceas, causando sérios prejuízos que podem chegar até 100% de perdas, dependendo da cultura (Colariccio et al., 2001). No Brasil, é uma doença de grande importância econômica nas culturas da pimenta, do pimentão e do tomate. Durante as últimas décadas, além do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), foram identificadas as espécies *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), responsáveis por grandes danos econômicos em importantes culturas no Brasil (Pozzer et al., 1999; Bezerra et al., 1999).

O surgimento, na década de 90, de uma espécie descrita a partir de plantas de pimentão, o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV, família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*) (Inoue-Nagata et al., 2002) infectando o tomateiro, foi relatado como sendo fator limitante a produção. Já na década seguinte, a incidência do PepYMV em plantios de tomateiro aumentou consideravelmente no Brasil, com relatos de perdas de até 100% no Espírito Santo.

O PepYMV causa sintomas de mosaico severo, deformação foliar e nanismo das plantas de tomateiro (Maciel-Zambolim et al., 2004; Ávila et al., 2004).

2.2 *Tospovirus*

O gênero *Tospovirus* pertence à família *Bunyaviridae*, sendo constituídos por vírus de RNA fita simples negativa e são os únicos vírus de plantas conhecidos que possuem partículas com morfologia complexa, sendo aproximadamente esféricas e envolvidas por um envelope lipídico. No Brasil, esses vírus causam a doença chamada vira-cabeça-do-tomateiro, assumindo maior importância nas épocas quentes do ano (German et al., 1992). A primeira ocorrência dessa doença em tomateiro no Brasil foi feita em 1938 por Costa & Foster, e, por muito tempo, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) foi considerada a única espécie de vírus responsável por essa doença (Lourenção et al., 1999).

Os tospovírus são transmitidos facilmente por meios mecânicos (Costa, 1998) e são naturalmente transmitidos em maneira circulativa e propagativa (ocorre quando o vírus é adquirido pelo canal alimentar do vetor e translocado para outras partes do seu corpo, podendo multiplicar-se neste), por insetos da ordem Thysanoptera (gênero *Frankliniella* e *Trips*), conhecidos como tripes (Costa, 1998; Paliwal, 1974; Sakimura, 1962). O inseto adquire o vírus durante a fase larval e em condições de campo só inicia o processo de transmissão quando o inseto atinge a fase adulta (Wijkamp et al. 1993; Wijkamp & Peter 1993). O inseto na fase adulta não adquire o vírus devido a uma barreira histológica localizada no intestino, que aparentemente impede a fixação dos vírions (Medeiros & German 2000; Ullman et al., 1992).

Os sintomas provocados por tospovírus variam muito de acordo com a espécie viral, o hospedeiro e as condições ambientais, mas, de modo geral, observam-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 das plantas (German et al. 1992; Nagata et al. 1995; Pozzer et al. 1996).

As partículas virais são esféricas e envolvidas por uma membrana lipídica, denominada envelope, e associadas a essa membrana estão as glicoproteínas Gc e Gn, responsáveis pela interação do vírus com seu vetor, determinando a transmissão e a especificidade (Wijkamp et al., 1995; Ullman et al., 2005). O genoma dos tospovírus codifica seis proteínas a partir de cinco ORFs presentes em três RNAs de fita simples

denominados RNAs L (senso negativo), que sintetiza a polimerase dependente de RNA; M (ambisenso), que sintetiza as proteínas NSm (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) e precursores de Gc e Gn; e S (ambisenso), que sintetiza a proteína NSs (supressora do silenciamento gênico) e a proteína N que forma o nucleocapsídeo viral e é envolvida na regulação da transcrição/replicação (de Ávila, 1993; Takeda et al., 2002; Bucher et al., 2003; Snippe et al., 2007). Todos os segmentos gênicos de tospovírus possuem um conjunto de oito nucleotídeos conservados (5' - AGAGCAAT-3') e complementares nas extremidades 5' e 3', o que leva à formação de uma estrutura secundária dos segmentos gênicos virais conhecido como cabo de panela (“panhandle”). Esta estrutura é comum para a maioria dos vírus de ssRNA(+)/(-) (Walpita & Flick, 2005) e essencial para a iniciação de todos os processos de replicação/transcrição dos vírus (Kawoka, 2004).

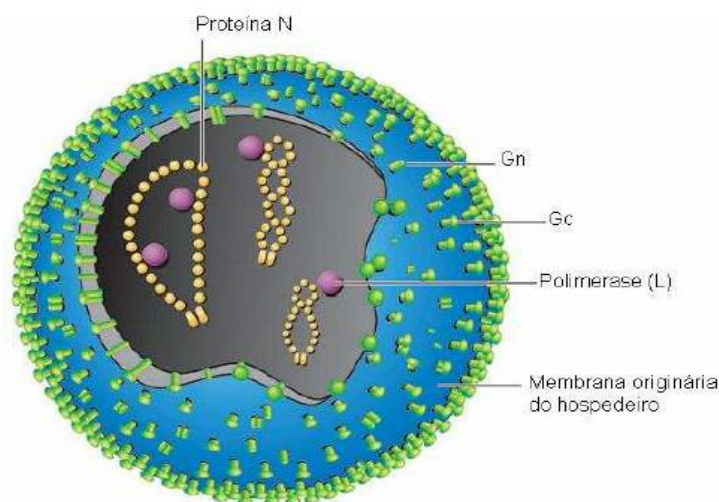


Figura 1. Partícula de um tospovírus. A membrana lipídica contém as glicoproteínas (Gn e Gc). As três estruturas localizadas na parte interna correspondem às ribonucleoproteínas (RNPs), formadas por RNA viral encapsulado pela proteína N e a polimerase (L) (adaptada de Hogenhout et al., 2008)

Todas as proteínas estruturais (proteína da polimerase viral - L, proteína do nucleocapsídeo - N e o precursor das glicoproteínas Gn e Gc) estão codificadas no cRNA (RNA complementar) viral, o que significa que para a sua produção o vírus precisa transcrever a fita complementar ao RNA genômico viral usando sua polimerase. Para tanto, a proteína L é empacotada nas partículas virais nascentes em associação ao complexo ribonucleoproteico (Nichot et al., 2005).

A proteína NSm por sua vez, é responsável pelo movimento célula a célula do vírus (de fato, são os complexos ribonucleoproteicos que se movimentam célula a célula, não as partículas virais) por meio da formação de túbulos e possivelmente também está envolvida na sintomatologia viral (Kormelink et al., 1994; Storms et al., 1995; Soellick et al., 2000; von Bargen et al., 2001; Lewandowski & Adkins, 2005; Paape et al., 2006; Li et al., 2009a,b). Além disso, a proteína NSm parece ser responsável pela determinação da avirulência (interação gene a gene) e capacidade de quebra de resistência conferida pelo gene *Sw-5* em tomate (*S. lycopersicum*) (Lopez et al., 2011).

As glicoproteínas dos tospovírus são também essenciais para a coordenação do processo de montagem de novas partículas virais, que se dá entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi da célula infectada (Ribeiro et al., 2008; Ribeiro et al., 2009). Em adição, descobriu-se que essas proteínas interagem fisicamente com a proteína do nucleocapsídeo durante a montagem de novas partículas virais (Ribeiro et al., 2009) e que são elas as possíveis responsáveis pelo formato da partícula viral madura, fato demonstrado para o hantavírus *Tula virus* (Huiskonen et al., 2010).

A proteína N é um componente importante da replicação viral em tospovírus, pois está associada à mediação da interação entre os RNAs virais e a polimerase para a formação dos complexos ribonucleoprotéicos, além de ser a proteína responsável pela interação (Richmond et al., 1998), integridade e coordenação do RNA viral (Mir & Panganiban, 2006) durante todo o processo infeccioso, incluindo seu processamento pela RNA polimerase viral, como sugerido para o *Rift valley fever virus* (RVFV) (Ferron et al., 2011) e para outros vírus de ssRNA(-) (Walpita & Flick, 2005). Trata-se também da proteína mais diversa entre as espécies de *Tospovirus*, fator pelo qual é usada como principal critério taxonômico do gênero, a diferenciação de espécies virais (TSWV e GRSV) é baseada em análises filogenéticas da proteína N (Nichot et al., 2005).

2.3 *Potyvirus*

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

O genoma compreende uma única ORF (Open Reading Frame) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 345 kDa. Nas suas extremidades encontram-se duas regiões não traduzidas (NTR), uma ligada covalentemente a VPg (viral protein genome-linked) na extremidade 5' e outra no terminal 3' ligada a uma sequência de adenina (Poly A) (Hari et al., 1979; Urcuqui-Inchima et al., 2001). A poliproteína dos potyvirus é processada através de três proteases virais, sendo estas de vital importância para o ciclo de vida do patógeno. As proteases P1 e HC-Pro autoclivam-se. Já a NIa protease está envolvida em seu próprio processo de clivagem em *cis* e em seis clivagens adicionais em *trans* (Daros & Carrington, 1997). Estes processos de clivagem geram nove proteínas: P1, HC-Pro, P3-PIPO, 6k1, CI, 6k2, NIa, NIb e CP. Uma importante característica dos potyvirus é que a maioria das proteínas formadas é multifuncional e são produzidas em quantidades estequiometricamente idênticas (Urcuqui-Inchima et al., 2001).

A proteína capsidial é importante para o desenvolvimento da infecção viral, pois está relacionada aos movimentos célula-a-célula, a longa distância e na replicação viral. Possui três regiões distintas contendo uma extremidade amino-terminal que é variável em tamanho e sequência, uma região central conservada com cerca de 215 a 227 aminoácidos e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos (Shukla et al., 1991). Na região Nterminal está localizada a sequência de aminoácidos DAG (Asparagina - Asp, Alanina - Ala, Glicina - Gly), altamente conservada entre os potyvirus transmitidos por afídeos. Mutações de aminoácidos realizadas nesta sequência ou mudanças em áreas próximas resultam na perda ou na redução da transmissão dos vírus pelos afídeos (Atreya et al., 1991; Atreya et al., 1995).



Figura 2. Partícula de *Potyvirus* de 720-850 nm de comprimento e 12-15 nm de diâmetro. (Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html)

A transmissão dos potyvirus ocorre na natureza através dos afídeos em uma relação não persistente, havendo uma interação das partículas virais com a HC-Pro e CP

(Pirone & Blanc, 1996). Atreya et al., (1992), verificaram que mutações na região 5' terminal da HC-Pro do TVMV (*Tobacco vein mottling virus*) afetam a transmissão por afídeos assim como na virulência do vírus.

As proteínas CI (Cylindrical Inclusion), que possuem a função de helicase e NIB (Nuclear Inclusion b), com função de polimerase (RdRp – RNA polimerase dependente de RNA), são as principais responsáveis pela replicação viral, que ocorre no citoplasma da célula vegetal (Urcuqui-Inchima *et al*, 2001). A proteína CI forma inclusões cilíndricas denominadas “cata-vento”, características da família *Potyviridae* (Murphy et al., 1991). A proteína NIB, forma inclusões nucleares, assim como a proteína NIa (VPg-Pro), que é a principal protease viral (Urcuqui-Inchima et al., 2001).

Os potyvírus são transmitidos por afídeos de maneira não-circulativa, se depositando no estilete dos vetores. Desse modo, pode ser transmitido em apenas alguns segundos após a aquisição em uma hospedeira infectada. Por essa razão, o controle através da erradicação dos vetores se demonstra bastante ineficiente (Nagai, 1993). Membros da família *Potyviridae* são facilmente transmitidos experimentalmente de plantas infectadas para plantas saudáveis, pela inoculação via extrato vegetal tamponado ou utilizando preparações virais purificadas ou concentradas (Berger et al., 2005).

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

Em tomate, PepYMV causa desde um mosqueado leve, até um mosaico forte que toma toda a superfície foliar. Pode causar grande redução na produção, mas não foram reportados sintomas em frutos (Inoue-Nagata et al., 2002; Maciel-Zambolim et al., 2004). Os sintomas causados em plantas indicadoras são extremamente similares aos causados por PVY. Para se realizar a diferenciação dos isolados, recomenda-se o uso de *Datura metel*, que apresenta clareamento de nervuras, mosqueado e deformação foliar quando infectado

por PVY e pontos necróticos que podem evoluir até a morte da planta quando infectada por PepYMV (Inoue-Nagata & Resende, 2008).

De fato, a incidência de PepYMV na cultura do tomateiro vem aumentando nos últimos anos, demonstrando a necessidade de busca de alternativas visando diminuir as perdas causadas por esse vírus. Em um levantamento realizado em campos de produção do Distrito Federal, 85,2 % de 54 amostras coletadas estavam infectadas por PepYMV (Dianese et al., 2009). O uso da resistência genética é uma alternativa para diminuir os prejuízos causados por doenças causadas pelos vírus (Janzac et al., 2009a), por produzir proteção efetiva sem implicações adicionais de custos para o produtor, além de não exigir mudanças tecnológicas no sistema de produção e ser ambientalmente correto e mais seguro para o consumidor.

2.4 RESISTÊNCIA GENÉTICA A *Tospovirus* E *Potyvirus*

As plantas apresentam vários mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos (Durrang & Dong, 2004; Gur & Rushton, 2005). Uma das mais efetivas e mais estudadas respostas de defesa das plantas é mediada pelos genes de resistência (genes *R*). Estes genes conferem resistência a uma grande variedade de patógenos incluindo fungos, bactérias, nematóides, vírus e também insetos (Feys & Parker, 2000; Hammond-Kosack & Jones, 2000).

Para o controle de *Tospovirus*, diversas medidas têm sido estudadas, como combate aos tripes vetores, por métodos químicos, físicos ou biológicos, plantas transgênicas e obtenção de cultivares resistentes mediante melhoramento clássico. Nessa última linha, trabalhos têm sido realizados no Brasil e no exterior, procurando-se detectar e analisar germoplasma resistente (Zijl et al., 1986; Maluf et al., 1991; Nagai et al., 1992; Boiteux et al., 1993; Giordano et al., 1994, 1998; Juliatti et al., 1994, 1996; Lourenção et al., 1997; Melo & Carneiro, 1997; Resende et al., 1998; Dianese et al., 2011) bem como estudar aspectos da herança da resistência (Stevens et al., 1992; Boiteux & Giordano, 1993; Juliatti & Maluf, 1995; Juliatti et al., 1996; Resende et al., 1996).

Através dos anos, várias fontes de resistência genética aos tospovírus têm sido encontradas em avaliações de germoplasma de *Solanum* (secção *Lycopersicon*) contra isolados de tospovírus (principalmente TSWV) oriundos de regiões geográficas distintas (Samuel et al., 1930; Kikuta & Frazier, 1946; Holmes, 1948; Finlay, 1953; Nagai, 1975;

Araújo et al., 1983; Paterson et al., 1989; Maluf et al., 1991; Boiteux et al., 1993; Nagata et al., 1993; Nagai, 1993; Stevens et al., 1994; Lourenção et al., 1997; Canady et al., 2001; Scott et al., 2005; Gordillo et al., 2008). As principais fontes de fatores de resistência a tospovírus têm sido identificadas na espécie *S. peruvianum*. Vários acessos foram identificados apresentando respostas do tipo imunidade ou com reações de hipersensibilidade (Paterson et al., 1989; Stevens et al., 1994; Roselló et al., 1999).

Devido à grande gama de hospedeiros e da dificuldade de controle do vetor, o uso da resistência torna-se uma prioridade para o controle dessa doença (Roselló et al. 1999; Stevens et al. 1992). O primeiro gene de resistência a TSWV identificado foi o *Sw-5*, que confere resistência de amplo espectro a TSWV, GRSV, TCSV e CSNV. Esse gene foi incorporado a *S. lycopersicum* a partir de acessos de *S. peruvianum* (Stevens et al. 1992; Thompson & Zijl, 1996). Vários estudos demonstraram que a resistência mediada por *Sw-5* é eficiente contra as espécies de *Tospovirus* que infectam o tomateiro e devido ao caráter não específico dessa resistência, esse gene tornou-se o mais utilizado em programas de melhoramento (Ávila 1993; Boiteux & Giordano 1993; Roselló et al. 1999).

Fontes de resistência têm sido identificadas em *S. pimpinellifolium* (Finlay, 1953), *S. habrochaites* (Araujo et al., 1983), *S. peruvianum* (Finlay, 1952) e mesmo em *S. esculentum* (cultivares Rey de los Tempranos e Manzana) (Holmes, 1948), mais recentemente, no cultivar Stevens (Stevens et al., 1992; Nagai et al., 1993), em *S. arcanum*, *S. chilense* e *S. corneliomuelleri* e incorporadas a *S. Lycopersicum*, nas cultivares Viradoro, Duradoro (Dianese et al., 2011).

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

De acordo com o mecanismo de ação da resistência, esta é classificada como dominante ou recessiva. Em relação ao controle de potyvírus via resistência genética em solanáceas, segundo Kyle & Palloix, (1997), entre os 16 genes de resistência de efeito maior contra potyvírus, oito são recessivos; em pimentão, no mínimo, sete são de efeito maior, denominados genes *pvr* (*potyvirus resistance*). Vários desses genes, dominantes ou recessivos, já foram descritos e introduzidos em cultivares comerciais (Provvidenti; Hampton, 1992). Entre esses, o gene *Pvr4*, dominante e obtido do germoplasma de pimentão

C. anuum Serano Criollo de Morelos 334 (CM334), foi inserido em muitos híbridos de pimentão na década de 1990, conferindo resistência eficiente contra todos os isolados dos potyvírus *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PepMoV) e *Ecuadorian rocoto virus* (ERV). Gioria et al. (2009) relataram a presença do PepYMV em plantas de pimentão ‘Magali R’ (*Pvr4/Pvr4*), um híbrido caracterizado como resistente ao vírus, em campos de produção localizados na cidade de Lins, SP, demonstrando assim a ocorrência da quebra de resistência genética.

Alguns levantamentos preliminares buscando identificar acessos resistentes ao vírus já foram realizados (Juhász et al., 2006), porém, sem conclusões definitivas, apontando como possível fonte de resistência acessos selvagens da espécie *Solanum habrochaites*. Dianese et al. (2011), confirmaram a importância de *S. habrochaites* como fonte de resistência múltipla a *Potyvirus*, e relataram pela primeira vez, resistência genética a PepYMV em acessos de outras espécies de *Solanum*, como *S. corneliomuelleri* e *S. peruvianum*, o que representa a ampliação da base genética de fatores de resistência à espécies deste gênero.

2.4.1 Resistência dominante à *Tospovirus*

O gene dominante *Sw-5*, introduzido no tomateiro cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) a partir da espécie selvagem *S. peruvianum*, confere resistência aos tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (Stevens et al., 1992; Boiteux & Giordano, 1993; Brommonschenkel & Tanksley, 1997).

A resistência conferida por *Sw-5* caracteriza-se pela ausência de sintomas na planta inoculada ou pela ocorrência de lesões necróticas nos sítios de infecção. Este tipo de reação, denominada resposta de hipersensibilidade (HR - *hypersensitive response*), é um mecanismo de resistência induzível das plantas hospedeiras, caracterizado por uma morte celular rápida e localizada no sítio de infecção (Dangl & Jones, 2001). Esta morte celular localizada leva à ativação de respostas de defesa local e sistêmica (Greenberg & Yao, 2004).

O gene *Sw-5* compõe uma família multigênica com membros dispersos nos cromossomos 9 e 12 do tomateiro (Brommonschenkel et al., 2000). Através do mapeamento do *Sw-5* ao longo do cromossomo 9, verificou-se um complexo formado por cinco cópias do gene, nomeadas de *Sw-5a*, *Sw-5b*, *Sw-5c*, *Sw-5d*, *Sw-5e*. As cópias *Sw-5a* e *Sw-5b* possuem domínios estruturais que os tornaram candidatos a genes de resistência, porém quando

plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com ambos os genes, revelou que somente *Sw-5b* é necessária e suficiente para conferir resistência a TSWV, sendo então identificada como a cópia funcional do gene *Sw-5* (Spasova et al., 2001).

A proteína codificada por este gene possui 1246 aminoácidos e caracteriza-se pela presença de domínios de ligação a nucleotídeos (*nucleotide binding site*, NBS) e repetições ricas em leucina (*leucine rich repeats*, LRR) (Brommonschenkel et al., 2000). Estas características estruturais são típicas de proteínas envolvidas na resposta de fitopatógenos (Martin et al., 2003; Belkhadir et al., 2004). A proteína *Sw-5* faz parte de uma classe que inclui, entre outras, as proteínas Mi (Milligan et al., 1998), I2C (Ori et al., 1997), RPM1 (Grant et al., 1995), Prf (Salmeron et al., 1996) e Rx (Bendahmane et al., 1999), que conferem resistência a nematóides, fungos, bactérias e vírus, respectivamente.

Modelos propõe que as proteínas codificadas pelos genes *R* podem atuar como receptores diretos ou indiretos de proteínas codificadas pelos patógenos ou ainda, como sensores detectando alterações celulares provocadas por proteínas do patógeno (Nimchuk et al., 2004). Em consequência deste reconhecimento, a ativação de vias de transdução de sinais relacionadas a diversos mecanismos de defesa levam à restrição do patógeno no sítio de infecção (Baker et al., 1997; Somssich & Hahlbroch, 1998). As estratégias de defesa de plantas a patógenos incluem o aumento intracelular da concentração de espécies reativas de oxigênio, a lignificação e o fortalecimento de paredes celulares, a produção de substâncias antimicrobianas como as fitoalexinas e a indução da expressão de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), bem como de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico, responsáveis pela ativação de respostas de defesa em células adjacentes (*Localized Acquired Resistance*, LAR) e tecidos mais distantes do sítio primário de infecção na planta (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) (Hutcheson, 1998; Durrant & Dong, 2004). A resposta da resistência pode, muitas vezes, ser visualizada macroscopicamente na forma de lesões necróticas restritas ao sítio de infecção (Resposta de Hipersensibilidade, HR) (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

2.4.2 Resistência recessiva à *Potyvirus*

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

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

Segundo Parrella et al. (2002), a resistência contra *Potato virus Y* (PVY) e *Tobacco etch virus* (TEV) foi identificada no acesso selvagem de tomateiro *S. habrochaites* (antigo *Lycopersicon hirsutum*) PI247087. As análises de segregação da progênie indicaram que dois locos recessivos estão envolvidos na resistência a essas potyvirose, *pvr2* e *pot-1*, que estão localizados em uma região genômica colinear. O mecanismo de resistência controlado por esses genes é pela restrição do movimento célula-a-célula da proteína do capsídeo (CP), o que impede o acúmulo de vírus nos tecidos.

Ruffel et al. (2005) relataram que o gene de resistência recessivo *pvr2* de pimentão e o gene *pot-1* de tomateiro, correspondem ao fator de iniciação da tradução 4E (eIF4E). O eIF4E ou sua isoforma, o eIF(iso) 4E, são genes recessivos de resistência a potyvírus em diversas culturas, incluindo a alface (gene *mo11*, resistência ao *Lettuce mosaic virus*, LMV) (Nicaise et al., 2003) e a ervilha (gene *sbm1*, resistência ao *Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) (Gao et al., 2004).

Além disso, Zhang et al. (2009) realizaram a clonagem e a caracterização molecular do eIF4E e sua isoforma eIF(iso)4E de plantas de tomateiro e demonstraram, por meio de análise filogenética, que as sequências desses dois genes são semelhantes entre espécies da família *Solanaceae*, como o tabaco, o tomateiro e o pimentão. Esses resultados sugerem a relação entre os genes de resistência a potyvírus em espécies botanicamente relacionadas, e a possibilidade do uso de estratégias conjuntas para identificação e clonagem de genes de resistência a potyvírus pertencentes às espécies de plantas dessa família.

Segundo Nicaise et al. (2003), a resistência mediada por eIF4E/eIF(iso)4E impede a multiplicação viral em nível celular. Em alguns casos, entretanto, o acúmulo

sistêmico de partículas virais ocorre em menor extensão e sem sintomas aparentes. A observação-chave na elucidação da natureza molecular da resistência recessiva foi a conclusão da participação da proteína viral (VPg) ou de sua precursora, a proteína NIa, ligando-se ao eIF4E ou a sua isoforma em ensaios de duplo-híbrido em levedura e em ensaios de ligação *in vitro* (Wittman et al., 1997; Léonard et al., 2000). A função dessa interação no ciclo de infecção viral é suportada por relatos afirmando que mutações na VPg que impedem a interação com o eIF(iso)4E *in vitro* também impedem a infecção viral na planta (Léonard et al., 2000).

Possíveis funções da interação entre o eIF4E e a VPg no ciclo de infecção dos potyvírus foram propostas por Lellis et al. (2002). A primeira delas tem relação com a iniciação da tradução do RNA viral, em que o eIF4E reconheceria a VPg e esse reconhecimento iniciaria o processo de montagem do complexo de tradução. A segunda estaria relacionada com a estabilidade do genoma, em que a interação eIF4E-VPg protegeria o RNA viral da ação de enzimas codificadas pela hospedeira. A terceira função se relaciona com o tráfego intracelular, em que o eIF4E interage com o eIF4G, uma proteína com atividade de ligação aos microtúbulos, de forma que a interação eIF4E-VPg estaria envolvida com o transporte do genoma viral interagindo com o maquinário de tráfego intracelular.

German-Retana et al. (2008) demonstraram que uma mutação natural do eIF4E/eIF(iso)4E leva a resistência recessiva ao vírus. Além disso, o eIF4E, ou sua isoforma, tem função na infecção e acumulação, não somente para potyvírus, mas, também, para vírus pertencentes aos gêneros *Cucumovirus* (Yoshii et al., 2004) e *Bymovirus* (Stein et al., 2005).

2.5 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores de DNA foram inicialmente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 80 (Soller & Beckmann, 1983). Segundo Milach (1998), os marcadores são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Ferreira & Grattapaglia (1998) definem como marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como por exemplo a isoenzima, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma).

Para complementar as informações e aumentar a base de conhecimento genético sobre os acessos de um banco de germoplasma, os marcadores moleculares têm sido um

instrumento de auxílio na caracterização dos bancos de germoplasma, pois revelam diferenças genéticas com maior precisão e sem os efeitos causados pela influência ambiental, oferecendo vantagens em termos de discriminação, confiabilidade e rapidez (Binneck et al., 2002).

Marcadores moleculares de DNA têm sido usados para sinalização de genes de resistência a doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma; introgressão gênica e seleção auxiliada por marcadores; desenvolvimento de mapas genéticos; determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose; reconstituição de “pedigrees”; testes de pureza genética; seleção de resistência a patógenos exóticos ainda inexistentes em determinada região; associação com caracteres quantitativos; estudos de interação genótipo-ambiente (Rafalski & Tingey, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a, 1998b).

Existe um grande número de marcadores moleculares disponíveis para diferentes espécies vegetais, e os principais marcadores de DNA podem ser classificados em dois tipos conforme a metodologia utilizada para identificá-los: a) marcadores baseados na hibridização com sondas específicas e b) aqueles com base na amplificação do DNA via reação de polimerização em cadeia (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) (Oliveira et al., 2007).

Os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) foram descritos primeiramente para fins de análise genômica (Botsten et al., 1980) e por mais de uma década, caracterizaram-se como a classe de marcadores mais amplamente utilizada em genética e melhoramento de plantas. Esta técnica baseia-se na hibridação de uma sonda com o DNA genômico previamente digerido com enzimas de restrição, em que a posição do sítio de corte desta enzima pode variar entre os diferentes indivíduos, gerando polimorfismo detectado via eletroforese (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A RFLP apresenta vantagens em relação aos demais métodos por analisar todo o genoma do organismo em estudo, e o polimorfismo encontrado independe de condições ambientais, da idade e do tipo de estrutura analisada, pois é o genoma ou o DNA do organismo em estudo que é empregado (Azevedo, 2008), porém requer grandes quantidades de DNA, e as análises são, em geral, demoradas e trabalhosas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O advento de técnicas baseadas em PCR apresentou uma nova opção ao uso de marcadores moleculares. A técnica foi desenvolvida em meados da década de 80 e alcançou

uso disseminado e extenso em diversas áreas de biologia quase que imediatamente (White et al., 1989). PCR é uma técnica poderosa usada para ampliar pequenas sequências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de ínfima quantidade de DNA. Baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de *primers* específicos ou não. Tais *primers* delimitam a sequência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (Mullis & Faloona, 1987; White et al., 1989).

O grande impulso na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu na década de 90 ao serem utilizados iniciadores mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a região de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da sequência a ser amplificada. A técnica RAPD originou uma grande expansão da análise de polimorfismo molecular ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Segundo Caixeta et al. (2006), as vantagens dos marcadores RAPD são simplicidade, rapidez na obtenção de dados, custo baixo comparado com outras técnicas moleculares e aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo. Requerem pequenas quantidades de DNA comparados com outras técnicas e não utilizam marcação radioativa, podem ser utilizados para a identificação rápida e eficiente de muitos polimorfismos e, como tais, apresentam enorme potencial na identificação de cultivares. Contudo, os marcadores moleculares RAPD ainda são criticados pela baixa reprodutibilidade entre os laboratórios e até mesmo dentro do mesmo laboratório (Freitas & Bered, 2003).

Para contornar essa limitação, marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores “Sequence Characterized Amplified Regions” (SCAR). Neste caso, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, sequenciada e dois “primers” mais longos que o original são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora numa temperatura de anelamento mais elevada. Nessa condição, o processo de amplificação é mais estável e reprodutível (Paran & Michelmore, 1993).

Dianese et al. (2010) avaliaram sete pares de primers para PCR que englobavam parte do locus Sw-5, para estabelecer um sistema de identificação para essa região genômica. O marcador SCAR foi avaliado através da análise de acessos de tomate suscetíveis e resistentes para verificar a sua capacidade de identificação da presença do Sw-5 em material genético de elite. Neste trabalho, o par de primers mais promissor para a seleção assistida por marcadores foi selecionado e denominado Sw-5-2.

O marcador co-dominante ‘Sw-5-2’ é considerado uma ferramenta robusta de seleção para o monitoramento da introgressão do gene *Sw-5* em acessos de tomate, sendo utilizado no monitoramento da presença deste gene em programas de melhoramento (Dianese et al., 2010). Ao lançar a cultivar ‘BRS Tospodoro’, Giordano et al. (2010), utilizaram esse par de primers para atestar a resistência a tospovirose. O par de primers identifica plantas resistentes e suscetíveis, e pode ser usado para a busca de órtologos ao gene *Sw-5* em outras espécies do gênero *Solanum*.

Moon (2006) afirma que a conversão de marcadores RAPD para marcadores SCAR é desejável, pois estes são fáceis de usar, menos trabalhosos, baratos e mais reprodutíveis. De acordo com Dianese et al. (2010), o marcador SCAR ‘Sw5-2’ é considerado de uso mais simples do que marcadores CAPS, como o descrito por Garland et al. (2005), pelo fato de que este marcador deve ser combinado a outro marcador CAPS para a verificação da resistência ou suscetibilidade, evitando falsos negativos, e que para discriminar plantas resistentes homozigotas e heterozigotas faz-se necessário uma digestão enzimática dos produtos PCR.

Panthee e Foolad (2012), em um estudo de re-validação de marcadores moleculares para seleção assistida em programas de melhoramento do tomateiro, utilizaram marcadores SCAR e CAPS em plantas homozigotas resistentes, homozigotas suscetíveis e heterozigotas resistentes. O resultado da análise com o marcador CAPS ‘Sw5b-LRR’, foi consistente com o resultado apresentado por Garland et al. (2005), discriminando apenas plantas consideradas resistentes; do mesmo modo aconteceu quando estes acessos foram testados com marcadores SCAR ‘SCR001’ e ‘SCR002’, descrito por Chague et al. (1996).

2.6 EVOLUÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E A ESTABILIDADE DO GENE *Sw-5*

A sobrevivência dos organismos depende da presença de sistemas genéticos específicos para manter a sua diversidade em resposta às alterações ambientais. Algumas espécies de plantas contêm genes de resistência a doenças altamente polimórficos relatados em suas sequências (Pryor & Ellis, 1993). Alterações no DNA são essenciais para a evolução dos genes de resistência, permitindo às plantas gerar um novo padrão de resistência que correspondam às mudanças de virulência dos patógenos (Pryor & Ellis, 1993).

Ashfield et al. (2004) estudaram dois genes de resistência a *Pseudomonas syringae* (agente causador do cretamento bacteriano) advindos de famílias de plantas distantes. Os genes RPM1 de *Arabidopsis thaliana* e o gene RPG-1b de *Glycine max* (soja), ainda que associados quanto a especificidade, possuem pouca relação filogenética, o que sugere a improbabilidade de que a especificidade seja derivada de um ancestral em comum, propondo que a evolução convergente, que ocorre quando uma característica (resistência) evolui independentemente em duas espécies sem que haja um denominador comum, é responsável pela geração dos genes. A maioria dos genes de resistência codificam o domínio NBS-LRR. Pan et al. (2000), através de um estudo filogenético, sugerem que a evolução divergente (uma característica em comum se diverge ao longo do tempo) é responsável pela diversidade dos genes de resistência que codificam o domínio NBS-LRR, e que podem ser agrupados em dois grupos (monocotiledôneas/dicotiledôneas) que se diferem nas sequências moleculares e distribuições filogenéticas. Cada grupo interage de forma diferente com o domínio NBS, permitindo o contato de genes de resistência com moléculas de sinalização. Song et al. (1997), ao estudar a evolução da família do gene Xa21, verificaram que recombinação, duplicação e transposição são os eventos que mais contribuem para a diversidade genética deste gene de resistência a doenças do arroz.

Em um estudo sobre a diversidade e evolução molecular do gene de resistência RPS2 em *Arabidopsis thaliana*, Caicedo et al. (1999), sequenciaram 17 acessos para explorar a diversidade do gene e encontraram alto grau de polimorfismo, que resultavam em alterações de aminoácidos, a através da construção de uma árvore filogenética determinaram a relação evolucionária entre os alelos.

Como apresentado anteriormente, o primeiro gene de resistência, denominado Sw-5, foi identificado em *Solanum peruvianum* e, após apresentar resistência ampla a espécies de Tospovírus, passou a ser introduzido por melhoramento genético em diferentes variedades de tomate (Stevens et al., 1992, Boiteux & Giordano, 1993). O locus onde se encontra o gene Sw-5 apresenta um agrupamento de genes, sendo que dois, nomeados Sw-5a e Sw-5b, possuem domínios estruturais que os tornaram candidatos a genes de resistência (Brommonschenkel et al., 2000; Spassova et al., 2001), e entretanto, quando plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com ambos os genes, foi revelado que somente o gene Sw-5b, e não Sw-5a, é necessário para conferir resistência contra TSWV. No entanto, a presença simultânea do alelo Sw-5a parece aumentar o grau de resistência (Spassova et al., 2001). Além de mostrar resistência contra TSWV, plantas de tomate contendo esse gene

mostraram-se resistentes a outras espécies filogeneticamente próximas, como TCSV e GRSV (Boiteux & Giordano, 1993). Não obstante, já foram relatados isolados de TSWV que conseguem quebrar a resistência conferida pelo gene *Sw-5* (Cho et al., 1996; Aramburu & Marti, 2002).

O genoma dos tospovírus é muito sujeito a mutações devido a sua constituição genética ser baseada em três segmentos de RNA. Como este não possui um mecanismo de reparo (*proof reading*) durante a replicação viral, os índices de mutação são elevados (Roossinck, 1997). Dessa forma, o surgimento de isolados capazes de suplantar genes de resistência estabelecidos é relativamente comum (Herrero et al., 2000). Em 2003, Aramburu et al. reportaram a ocorrência de um novo isolado de TSWV capaz de quebrar a resistência de plantas de tomate contendo o gene *Sw-5* no nordeste da Espanha. Fato esse confirmado em 2005, por Ciuffo et al., que relataram a ocorrência de isolado similar em regiões produtoras de tomate na Itália. O isolado espanhol, denominado GRAU, é o primeiro isolado de TSWV capaz de quebrar a resistência conferida por *Sw-5* e, aparentemente, se estabelecer nas áreas de cultivo.

Tentchev et al. (2011), ao estudar a diversidade e evolução de TSWV, relataram recombinantes de tospovírus a partir da análise filogenética de populações de diversos locais (América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa). Os autores sugerem que a existência de recombinantes virais pode ter ocorrido devido a infecção de mais de uma estirpe na mesma planta ou que estes recombinantes são advindos de outras áreas geográficas ou outras plantas hospedeiras.

Segundo Suzuki et al. (1992) as informações genéticas de um organismo estão contidas em seu material genético (DNA). As alterações que ocorrem no DNA, mas não provocam a morte do indivíduo, são, em sua grande maioria, repassadas aos seus descendentes. A ocorrência de erros na replicação ou transcrição da fita do DNA e na tradução do mRNA, bem como a ocorrência de mutações que provoquem inserção, deleção ou substituição de uma base nitrogenada, pode alterar um ou mais aminoácidos da proteína a ser formada, resultando em uma proteína mutante.

As mutações gênicas são importantes para a evolução biológica, pois elas produzem uma diversidade genética que pode ser expressa como uma variabilidade de características, as quais serão selecionadas ou não pelas condições do ambiente. Mesmo uma pequena mutação gênica pode ter grandes efeitos, dependendo do local do genoma, do gene que foi alterado e de que efeito a alteração tem na expressão do gene. Uma mutação gênica

que consista na mudança de um único nucleotídeo na sequência codificante de um determinado gene pode levar a uma perda completa de expressão do gene ou à formação de uma proteína variante com propriedades alteradas. Qualquer modificação no código genético de um organismo pode ser chamada de mutação. Tais modificações podem envolver alterações na sequência codificante ou na forma em que o código genético é organizado, e ocorrem como resultado de substituições em pares de bases envolvendo apenas um ou alguns poucos nucleotídeos. Caracteriza-se transição quando há substituição de purina por purina ou de pirimidina por pirimidina; e transversão, quando ocorre a substituição de uma purina por pirimidina, e vice-versa. Existem mutações que alteram a proteína, pois causam a substituição de um aminoácido na proteína em formação podendo alterar completamente a forma espacial e a função desta (Suzuki et al., 1992).

Nem todas as mutações gênicas são substituições de bases. Às vezes um nucleotídeo pode ser inserido ou excluído da sequência de bases do DNA. No processo de síntese protéica, cada trinca de bases corresponde a um determinado aminoácido; se uma ou duas bases são adicionadas ou excluídas, ocorre deslocamento do módulo de leitura (*frameshift mutation*), o que significa que toda a sequência de códons será alterada; conseqüentemente, a sequência de aminoácidos também não será mais a mesma. Inserções ou deleções de trincas de nucleotídeos podem apenas acrescentar ou excluir um aminoácido da cadeia polipeptídica. Isto significa que a proteína terá um determinado aminoácido a mais ou a menos, mas não terá toda a sequência de aminoácidos alterada. Grandes inserções e deleções gênicas podem levar a aumentos ou perdas consideráveis de material genético (Suzuki et al., 1992).

3 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A *TOSPOVIRUS* EM ACESSOS DE *SOLANUM* (SECÇÃO *LYCOPERSICON*).

RESUMO

O tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo, e isso constitui um fator importante para a sua vulnerabilidade ao ataque de pragas e doenças, que contribuem para a diminuição da produção na cultura e afeta a qualidade do fruto. Dentre as doenças na cultura do tomateiro, destacam-se as de etiologia viral, que apresentam maior dificuldade de controle, sobressaindo àquelas causadas por espécies do gênero *Tospovirus*, que podem causar perdas de até 100% na cultura. Os tospovírus são responsáveis pela doença conhecida como ‘vira-cabeça do tomateiro’, e são transmitidos por espécies de tripses. No Brasil há a ocorrência de quatro espécies de tospovírus afetando tomateiros: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), sendo a GRSV a espécie de maior incidência. Plantas infectadas com tospovírus apresentam sintomas de bronzeamento, anéis cloróticos nas folhas e necróticos nos frutos, e necrose nos pecíolos. A resistência genética é o melhor método para o controle da doença, sendo o desenvolvimento de cultivares que apresentam resistência à tospovirose um importante progresso para programas de melhoramento. Há quase setenta anos tem sido caracterizados acessos de germoplasma de *Solanum* em busca de fontes de resistência a tospovírus, e a espécie *S. peruvianum* foi identificada como principal fonte de resistência, apresentando respostas de imunidade, reação de hipersensibilidade ou tolerância quando inoculada com isolados de tospovírus. O primeiro gene de resistência a TSWV identificado foi o *Sw-5*, que é eficiente contra todas as espécies de tospovírus que infectam o tomateiro, sendo amplamente utilizado em programas de melhoramento por este motivo e por ser um gene de resistência com característica dominante. Fontes de resistência foram encontradas em outros acessos selvagens de *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium*, *S. corneliomuelleri* e *S. lycopersicum*, sendo estas espécies fontes promissoras de resistência para serem utilizados em programas de melhoramento. Visando identificar em acessos selvagens do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças fontes potenciais de resistência a tospovirose, e a partir da análise evolutiva do gene *Sw-5* através da filogenia de acessos selvagens, agrupando-os em grupos evolucionários, executou-se o presente trabalho. A análise evolucionária apresentou espécies de tomateiros diferentes que conferem resistência ampla às espécies de tospovírus e possuem o gene *Sw-5*, se enquadrando em grupos evolucionários distintos. Os acessos selvagens das espécies *S. chilense* e *S. habrochaites* que apresentaram padrão de bandas compatível com a resistência podem fornecer alelos diferenciados da fonte de resistência baseada em *S. peruvianum*, já que se agruparam em outros ramos da árvore filogenética, com potencial para contribuir com a manutenção da resistência conferida por *Sw-5*.

Palavras-chave: Tospovirus, Sw-5, fontes de resistência, grupos evolucionários.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE *TOSPOVIRUS* RESISTANCE IN *SOLANUM* (SECTION *LYCOPERSICON*) ACCESSIONS.

Tomato is one of the most cultivated vegetables worldwide, and this is an important factor in their vulnerability to attack by pests and diseases, which contribute to the decrease in production and affects the quality of the fruit. Among diseases affecting tomato production, the ones caused by viruses are of the utmost importance, which are more difficult to control, highlighting those caused by species of the genus *Tospovirus*, which can cause losses of up to 100 %. The tospoviruses are responsible for the disease known as 'tomato spotted wilt' and are transmitted by thrips. In Brazil, four species of tospoviruses occur in tomato: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) and *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), with a greater incidence of GRSV. Infected plants show symptoms of tanning, chlorotic leaves and necrotic rings on fruits and necrosis on petioles. Genetic resistance is the best method for control of the disease, with the development of resistant cultivars being regarded as the most important progress for breeding programs. For nearly seventy years the *Solanum* germplasm accessions have been characterized in search of sources of resistance to tospoviruses, and the species *S. peruvianum* was identified as the main source of resistance, presenting immune responses, hypersensitivity or tolerance when inoculated with tospovirus isolates. The first TSWV resistance gene identified was the *Sw-5*, which is effective against all species of tospoviruses infecting tomato and is widely used in breeding programs for this reason, because the resistance gene presents a dominant trait. Sources of resistance were found in other wild accessions of the species *S. chilense*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium*, *S. corneliomuelleri* and *S. lycopersicum*, showing promising results as sources of resistance for use in breeding programs. To identify a source of tospovirus resistance in wild accessions of the Germplasm Bank of Embrapa Hortaliças, and to perform the evolutionary analysis of the *Sw-5* gene through the phylogeny of wild accessions, grouping them into evolutionary groups, this work was realized. The wild accessions of *S. chilense* and *S. habrochaites* species that showed compatible type of bands with resistance, can provide differentiated alleles of the resistance source based in *S. peruvianum*, since they grouped in other branches of the phylogenetic tree, with the potential to contribute with maintenance of resistance conferred by *SW-5*.

Key words: Tospovirus, Sw-5, sources of resistance, evolutionary groups

3.1 INTRODUÇÃO

O tomate é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo, sendo consumido em suas diferentes formas, processado ou “in natura”. O tomateiro é originário da região Andina, que corresponde ao norte do Chile até o Equador. Foi introduzido na Espanha, a partir do México, no século XVI, sendo que no século XVIII já era largamente consumido em vários países europeus (Giordano & Ribeiro, 2000).

No Brasil esta hortaliça possui elevada importância sócio-econômica devido à grande demanda de mão-de-obra e à extensão da área cultivada. Em 2011, 69,5 mil hectares foram destinados à tomaticultura, com uma produção aproximada de 4,4 milhões de toneladas de frutos, dos quais 65% foram destinados ao consumo *in natura* e 35% destinados à indústria (IBGE, 2012). As principais áreas de cultivo de tomate encontram-se nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Bahia (IBGE, 2012).

O tomate é uma dentre muitas espécies autóctonas cultivadas que tiveram sua diversidade genética reduzida drasticamente; primeiro, devido a sua domesticação fora do centro de origem e, segundo, pelo melhoramento de plantas, que foi sendo feito ao longo dos anos com base em um número limitado de genótipos, cujas sementes foram coletadas pelos descobridores da América e levadas ao continente Europeu. Além disso, muitos genótipos foram perdidos ao longo do tempo, em consequência da substituição ou do desaparecimento de espécies silvestres, cultivares obsoletas e de variedades locais (Saavedra et al., 2001). Conseqüentemente, observa-se um alto grau de uniformidade nas variedades, tornando a cultura altamente vulnerável a pragas e doenças (Carelli, 2003).

O cultivo ininterrupto do tomateiro também favorece o aparecimento de diversas doenças que diminuem a produção e afetam a qualidade do fruto. Essas doenças são causadas por diversos patógenos, sendo as de origem viral que apresentam maiores dificuldades de controle. No Brasil, as principais doenças de origem viral são causadas por espécies de vírus dos gêneros *Begomovirus*, *Tospovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* e mais recentemente por espécies de *Crinivirus* (Barbosa et al. 2010).

Os tospovírus (família *Bunyaviridae*) são responsáveis pela doença conhecida como “vira-cabeça-do-tomateiro” que causa perdas anuais em cultivos de tomates de mesa

e para processamento (de Ávila, 1993). Esses vírus são transmitidos por tripes de maneira circulativa/propagativa (Wijkamp et al., 1993). Espécies desse gênero possuem distribuição mundial e apresentam grande diversidade de espécies virais infectando uma vasta gama de hospedeiros. O *Groundnut ringspot virus* (GRSV) é a espécie de tospovírus prevalente em plantios de tomate no Brasil. As plantas suscetíveis geralmente apresentam sintomas de bronzeamento e/ou manchas em anéis cloróticos nas folhas, necrose de pecíolos, anéis necróticos em frutos e necrose generalizada (Lopes & de Ávila, 2005).

Devido às dificuldades encontradas no combate ao inseto vetor, o desenvolvimento de cultivares de tomate com resistência à virose é o melhor método para o controle da doença. A seleção de plantas resistentes é feita através do processo de transferência de alelos de resistência, por meio de marcadores moleculares, que levam a resultados mais rápidos, além de não depender de condições ambientais e do estágio de desenvolvimento da planta para realizar a seleção (Nogueira, 2005; Nogueira et al., 2007).

Peralta et al. (2006), reagruparam os tomates ao gênero *Solanum*, baseados em análises da sequência de DNA, relações filogenéticas, características morfológicas e distribuição geográfica. Foram reconhecidas 13 espécies de tomates selvagens, incluindo o tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*), além de outras quatro espécies estreitamente relacionadas (*S. juglandifolium*, *S. lycopersicoides*, *S. ochranthum*, *S. sitiens*).

A espécie *Solanum peruvianum* é a mais importante fonte de resistência contra espécies de *Tospovirus*, a qual apresenta resistência de amplo espectro para todas as espécies virais encontradas na América do Sul, com plantas livres de infecção sistêmica quando inoculadas, porém fontes de resistência alternativas foram identificadas em acessos das espécies *S. chilense*, *S. corneliomuelleri* e *S. lycopersicum*. O surgimento de novos isolados virulentos ao gene *Sw-5* demanda ações de pesquisa visando à busca por fontes alternativas de resistência às diferentes espécies de Tospovírus que infectam tomateiro. A identificação de tais fontes é extremamente desejável, especialmente no sentido de antecipar problemas econômicos com a potencial emergência e predominância de novas estirpes, patótipos e espécies virais capazes de infectar plantas contendo o gene *Sw-5* (Dianese et al., 2011).

Dianese et al. (2011) relataram que o acesso denominado ‘CNPH 1737’ da espécie *S. lycopersicum*, não apresentou sintomas de infecção quando inoculado com as quatro espécies neotropicais de Tospovírus, sendo este acesso uma seleção da variedade ‘Rey de los Tempranos’. Acessos de *S. chilense* já foram reportados anteriormente como fonte de resistência a tospovírus (Stevens et al., 1994). O acesso ‘LA 1938’, material

derivado de *S. chilense*, apresentou resistência a um isolado havaiano de TSWV capaz de quebrar a resistência conferida por *Sw-5* e trabalhos relacionados com linhagens avançadas derivadas de *S. chilense* indicam resultados bastante promissores (Canady et al., 2001; Scott et al., 2005). É interessante mencionar que o acesso de *S. chilense* 'LA 1967' é uma interessante fonte de genes de resistência a doenças, sendo detectados bons níveis de tolerância a espécies de *Begomovirus* bipartidos (Giordano et al., 1998; Santana et al., 2001) e resistência do tipo imunidade ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 (Reis & Boiteux. 2007).

Ao analisar os resultados para inoculação com quatro espécies neotropicais de tospovírus, Dianese et al. (2011), relataram que alguns materiais foram variáveis em um ensaio, e sugeriram que estes possam conter genes de resistência ainda não identificados, uma vez que muitos dos acessos avaliados são auto-incompatíveis e com tendência a alogamia. A seleção de materiais considerados fontes de resistência pode ser efetiva dentro de acessos de *S. peruvianum*, *S. corneliomuelleri* e *S. chilense*, permitindo o aumento gradual da frequência de plantas resistentes.

Os genes de resistência se distribuem através da população e se modificam de acordo com as características intrínsecas à cada um. Essa variação ocorre principalmente devido à ocorrência de deleções, inserções e etc., estimuladas por eventos de recombinação, por exemplo, que levam à inativação ou ativação de um determinado gene ou até mesmo a diferentes níveis de expressão do mesmo. O objetivo do presente capítulo é a análise da evolução do gene *Sw-5*, que pode proporcionar informações suficientes para se determinar qual é o ancestral comum aos diferentes genótipos selvagens que apresentarem fenótipo ligado à resistência e como esses diferentes genótipos se agrupam, após avaliação com um marcador específico para o gene e testes de inoculação mecânica com um isolado do vírus.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal e ensaios em casa de vegetação

Inicialmente, foi avaliada a resistência de 62 acessos de tomateiros (linhagens e variedades) provenientes do programa de melhoramento do grupo CVR Plant Breeding, localizado na cidade de Rio Verde – GO e dez materiais promissores, anteriormente testados para resistência à tospovírus e pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças, compostos principalmente por acessos selvagens, foram analisados para

confirmação da ocorrência do gene de resistência *Sw-5* e posterior análise evolutiva do mesmo.

Todos os materiais foram semeados em bandejas de 128 poços com substrato agrícola (Plantmax®). Cerca de 20 a 30 dias após a germinação, período que tende a variar muito principalmente no grupo de acessos selvagens, quando as plantas apresentavam pelo menos um par de folhas verdadeiras, foram então transplantadas três mudas para vasos de 3 litros com solo autoclavado.

As plantas foram mantidas em casas de vegetação até apresentarem quantidade de folhas suficientes para serem utilizadas em análise molecular. Utilizando-se o marcador derivado do gene *Sw-5*, denominado *Sw-5-2* (F= 5' AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT 3' R= 5' TTCCGCATCAGCCAATAGTGT-3') (Dianese et al., 2010), eficiente na detecção da resistência a tospovírus em acessos de tomateiro.

3.2.2 Extração de DNA e ciclos PCR

Foi realizada PCR para confirmar a presença da região promotora do gene de resistência *Sw-5* nos acessos, utilizando-se o par de *primers* que amplificam essa região, como descrito por Dianese et al. (2010). O DNA genômico foi purificado como descrito por Boiteux et al. (1999) utilizando-se o método CTAB 2X modificado com passos extras de purificação com solventes orgânicos. O DNA foi amplificado por reações de PCR, utilizando: 1 µg de DNA, 1 µL de tampão para PCR 10X (Invitrogen), 0,3 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,7 µL de dNTP 2,5 mM, 100 ng de cada *primer*, 0,5 Unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água para um volume final de 10 µL. As reações foram amplificadas em um termociclador Biocycler (Biosystems®) seguindo-se o programa: desnaturação a 94° C por 2 minutos, 29 ciclos compostos por 94° C por 30 segundos, 50° C por 1 minuto e 72° C por trinta segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE.

3.2.3 Sequenciamento e análise do material selvagem resistente para análise evolutiva do gene *Sw-5*

A partir da análise inicial com o marcador *Sw-5-2* e observando-se o padrão de bandas apresentado pelo material selvagem, um primer “forward” que se alinha em uma

região interna da cópia funcional do gene *Sw-5* (*Sw-5b*) foi utilizado em combinação com o primer *Sw-5-2F*, denominado *Sw5-B 1* (5'-ACCGGTGAAGTATTTCCCAA-3'). As bandas obtidas foram visualizadas em gel de agarose 1%, recortadas do gel utilizando-se luz UV, purificadas utilizando o Purelink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen®) e sequenciadas. A reação de sequenciamento foi feita seguindo-se o protocolo do BigDye® terminator cycle sequencing versão 3.1 (Applied Biosystems of Brazil, São Paulo/SP) e 2 µl dos amplicons. O DNA foi analisado em um sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems of Brazil, São Paulo/SP) no Laboratório de Análise Genômica da Embrapa CNPH. A qualidade das sequências obtidas foi verificada através do programa SeqMan (Allelix, 1999). As sequências dos 13 acessos (dez acessos selvagens pertencem ao BAG da Embrapa Hortaliças, mais as cultivares Tospodoro, Viradoro e Stevens) foram alinhadas e comparadas entre si através do método ClustalW do programa Mega 6.06 (Tamura et al, 2013) e a figura foi gerada utilizando-se o programa CLC Main Workbench 6.9.2 (CLCBio, Aarhus, Denmark).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os acessos pertencentes a CVR Plant Breeding foram avaliados quanto a resistência a tospovírus utilizando-se o marcador *Sw-5-2*. As análises indicaram três padrões de bandas de DNA (Figura 3). Somente o acesso do grupo CVR (PI-1123023), variedade comercial, apresentou padrão de amplificação correspondente à plantas resistentes, com um amplicon entre 550 e 600 pb, assim como o controle resistente da variedade Viradoro. Cinquenta e sete acessos apresentaram amplicons de aproximadamente 400 pb, sendo considerados suscetíveis por se alinharem com o padrão apresentado pelo controle suscetível da cultivar Santa Cruz KADA.

Entre os 62 acessos analisados, quatro acessos apresentaram um padrão de bandas distinto dos demais. Os acessos 'PI-1123026', 'PI-1623027', 'PI-1623028' e 'CVR-2909', apresentando bandas duplas, o que deve-se ao fato de que a região amplificada por esse par de primers se alinha à região promotora tanto da cópia *Sw-5a* quanto da *Sw-5b*, ao se verificar as sequências amplificadas na ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A formação de bandas duplas pode ocorrer devido à deleção em uma região, mas não em outra. Para se verificar se esses acessos são suscetíveis ou resistentes, faz-se necessário realizar inoculação mecânica com um isolado de tospovírus.

Outro fator que pode ter influenciado a ocorrência de bandas múltiplas é o fato dos acessos ‘PI-1123026’, ‘PI-1623027’ e ‘PI-1623028’ serem híbridos. Provavelmente esses cruzamentos influenciaram a formação do locus, cuja herança resultou em regiões promotoras apresentando ou não a deleção relacionada com a resistência ou a suscetibilidade.

Para compor a análise evolutiva do gene *Sw-5*, dez acessos selvagens pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças foram previamente avaliados por Dianese et al. (2011) quanto à resistência a um isolado de tospovírus predominante na região (Tabela 1). O DNA de cada acesso foi extraído e amplificado com o marcador ‘Sw-5-2’, sendo em seguida amplificados novamente com a combinação dos primers ‘Sw-5-2R’ e ‘Sw-5b1’, purificados e sequenciados. Quanto a resistência somente o acesso ‘CNPH 457’ (Rey de los Tempranos) apresentou um padrão de amplicon correspondente à suscetibilidade (Figura 4), os demais acessos mostraram-se resistentes, apresentando padrão de amplicons de 550 a 600 bp. Maluf et al. (1991), relataram o cultivar Rey de los Tempranos como sendo o único acesso testado de *S. lycopersicum* (antigo *Lycopersicum esculentum*), que tinha um grau de tolerância a TSWV. Durante o período de 1986 a 1989, a partir do cruzamento de Rey de los Tempranos com outras espécies avaliou-se a evolução da resistência, constatando linhagens resistentes sob alta e baixa pressão do patógeno, indicando o progresso da introgressão de genes. Porém, na análise de resistência realizada por Dianese et al. (2010), em busca de fontes de resistência a tospovírus, o acesso Rey de los Tempranos foi suscetível ao isolado de GRSV.

Após o sequenciamento e análise das sequências utilizando-se a ferramenta BLAST, os acessos CNPH ‘938’, CNPH ‘939’ e CNPH ‘1194’, indicaram o maior nível de similaridade (99%) com a sequência base (Stevens – acesso AY007366.1), descrita por Spassova et al. (2001). O acesso CNPH ‘457’, o único comprovadamente suscetível, indicou o menor nível de similaridade, de 81%. As cultivares comerciais, ‘Viradoro’ e ‘Tospodoro’, apresentaram 98% de similaridade quando comparada com a sequência do acesso AY007366.1.

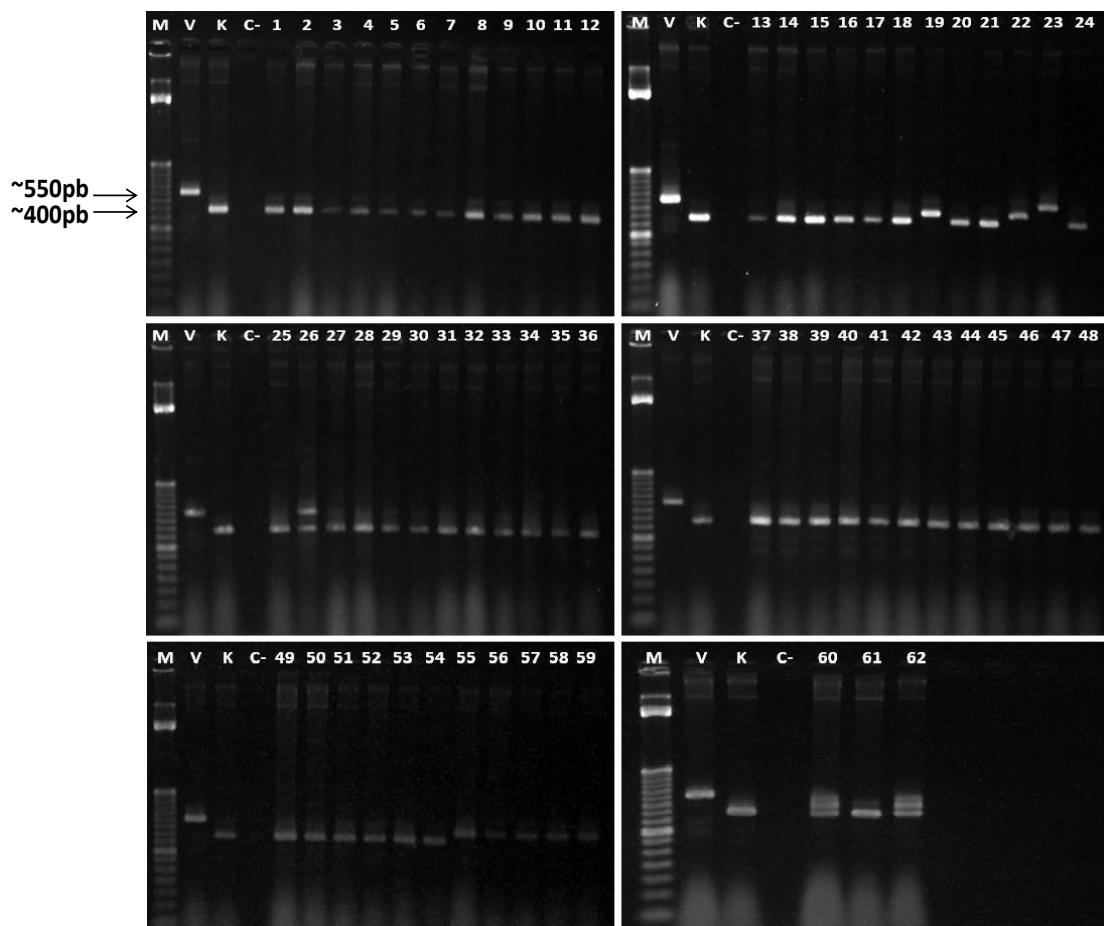


Figura 3. Perfil de amplificação do DNA genômico dos acessos de tomateiro pertencente ao grupo ‘CVR Plant Breeding’. M = marcador 50 pb (Invitrogen); V = ‘Viradoro’; K = ‘Santa Cruz Kada’; C- = controle negativo com água; 1 = ‘PI-1123001’; 2 = ‘PI-1123002’; 3 = ‘PI-1123003’; 4 = ‘PI-1123004’; 5 = ‘PI-1123005’; 6 = ‘PI-1123006’; 7 = ‘PI-1123007’; 8 = ‘PI-1123008’; 9 = ‘PI-1123009’; 10 = ‘PI-1123010’; 11 = ‘PI-1123011’; 12 = ‘PI-1123012’; 13 = ‘PI-1123013’; 14 = ‘PI-1123014’; 15 = ‘PI-1123015’; 16 = ‘PI-1123016’; 17 = ‘PI-1123017’; 18 = ‘PI-1123018’; 19 = ‘PI-1123019’; 20 = ‘PI-1123020’; 21 = ‘PI-1123021’; 22 = ‘PI-1123022’; 23 = ‘PI-1123023’; 24 = ‘PI-1123024’; 25 = ‘PI-1123025’; 26 = ‘PI-1123026’; 27 = ‘PI-1123027’; 28 = ‘PI-1123028’; 29 = ‘PI-1623001’; 30 = ‘PI-1623002’; 31 = ‘PI-1623003’; 32 = ‘PI-1623004’; 33 = ‘PI-1623005’; 34 = ‘PI-1623006’; 35 = ‘PI-1623007’; 36 = ‘PI-1623008’; 37 = ‘PI-1623009’; 38 = ‘PI-1623011’; 39 = ‘PI-1623012’; 40 = ‘PI-1623013’; 41 = ‘PI-1623014’; 42 = ‘PI-1623015’; 43 = ‘PI-1623016’; 44 = ‘PI-1623017’; 45 = ‘PI-1623018’; 46 = ‘PI-1623019’; 47 = ‘PI-1623020’; 48 = ‘PI-1623021’; 49 = ‘PI-1623022’; 50 = ‘PI-1623023’; 51 = ‘PI-1623024’; 52 = ‘PI-1623025’; 53 = ‘PI-1623026’; 54 = ‘PI-890213071’; 55 = ‘PI-890783091’; 56 = ‘PI-890783081’; 57 = ‘PI-890093531’; 58 = ‘PI-890533072’; 59 = ‘PI-890093073’; 60 = ‘PI-1623027’; 61 = ‘PI-1623028’; 62 = ‘PI-1623029’

Tabela 1. Identificação de acessos *Solanum* (Secção *Lycopersicon*) pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças. (Adaptada de Dianese et al., 2009)

Acesso CNPH	Nome comum	Espécie	Número de plantas positivas em ELISA/número de plantas			
			GRSV	TSWV	TCSV	CSNV
101	PI 306811-67-N-4	<i>S. peruvianum</i>	01/21	00/21	00/21	00/15
410	LA 1967	<i>S. chilense</i>	04/28	03/22	03/27	04/10
421	PI 127827 Rey de Los Tempranos	<i>S. habrochaites</i>	00/28	06/27	01/22	00/11
457	CGO 6713	<i>S. lycopersicum</i>	NA	NA	NA	NA
786	LA 1677	<i>S. peruvianum</i>	00/28	00/27	01/27	00/11
933	LA 111	<i>S. peruvianum</i>	03/28	02/22	01/22	00/11
936	LA 1113-1	<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	02/25	00/24	01/18	00/08
938	LA 1113-2	<i>S. corneliomuelleri</i>	00/20	01/22	01/22	00/06
939	CGO 8200	<i>S. corneliomuelleri</i>	01/21	01/26	02/26	00/11
1194	Viradoro	<i>S. peruvianum</i>	00/28	00/22	00/22	00/06
-		<i>S. lycopersicum</i>	NA	NA	NA	NA

NA – não avaliado

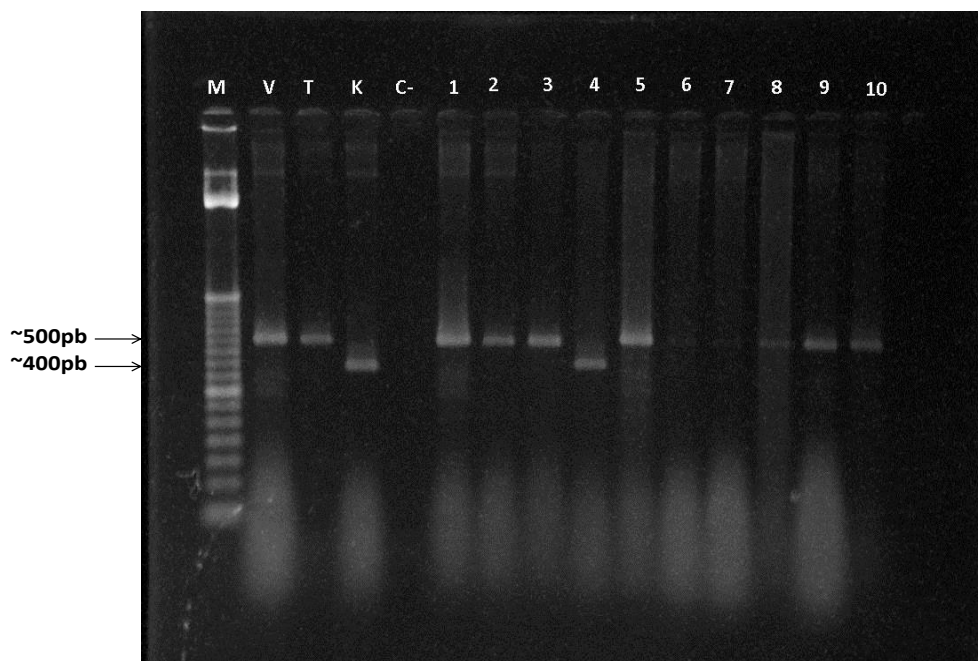


Figura 4. Perfil de amplificação do DNA genômico dos acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças. M = marcador 50 pb (Invitrogen); V = 'Viradoro'; T = 'Tospodoro'; K = 'Santa Cruz Kada'; 1 = 'CNPH 101' espécie *S. peruvianum*; 2 = 'CNPH 410' espécie *S. chilense*; 3 = 'CNPH 421' espécie *S. habrochaites*; 4 = 'CNPH 457' espécie *S. lycopersicum*; 5 = 'CNPH 786' espécie *S. peruvianum*; 6 = 'CNPH 933' espécie *S. peruvianum*; 7 = 'CNPH 936' espécie *S. peruvianum* var. *dentatum*; 8 = 'CNPH 938' espécie *S. corneliomuelleri*; 9 = 'CNPH 939' espécie *S. corneliomuelleri*; 10 = 'CNPH 1194' espécie *S. peruvianum*

O acesso CNPH '1194' pertence a espécie *S. peruvianum*, fonte inicial e mais importante de resistência a tospovírus, que passou a ser introgridida em diferentes variedades comerciais de tomate (Stevens et al., 1992, Boiteux & Giordano, 1993). Já os acessos CNPH '938' e CNPH '939' são da espécie *S. corneliomuelleri*, resistentes a tospovirose e relatados pela primeira vez por Dianese et al. (2009), como sendo resistentes a PepYMV, tornando-os uma possível alternativa para programas de melhoramento que preconizam a resistência a essas duas doenças viróticas.

As sequências geradas foram alinhadas e comparadas com a sequência do acesso AY007366.1, disponível no GenBank (Figura 5). O acesso CNPH '936', *S. peruvianum var dentatum*, apresentou uma inserção de 26 nucleotídeos a partir da posição 19, mutações de ponto do tipo transição e transversão, e deleção em alguns pontos da sequência. Uma grande deleção da posição 70 a 99 e mutações de ponto foram observadas no acesso CNPH '457' (Rey de los Tempranos), e similarmente no acesso CNPH '410', que apresentou 85% de similaridade.

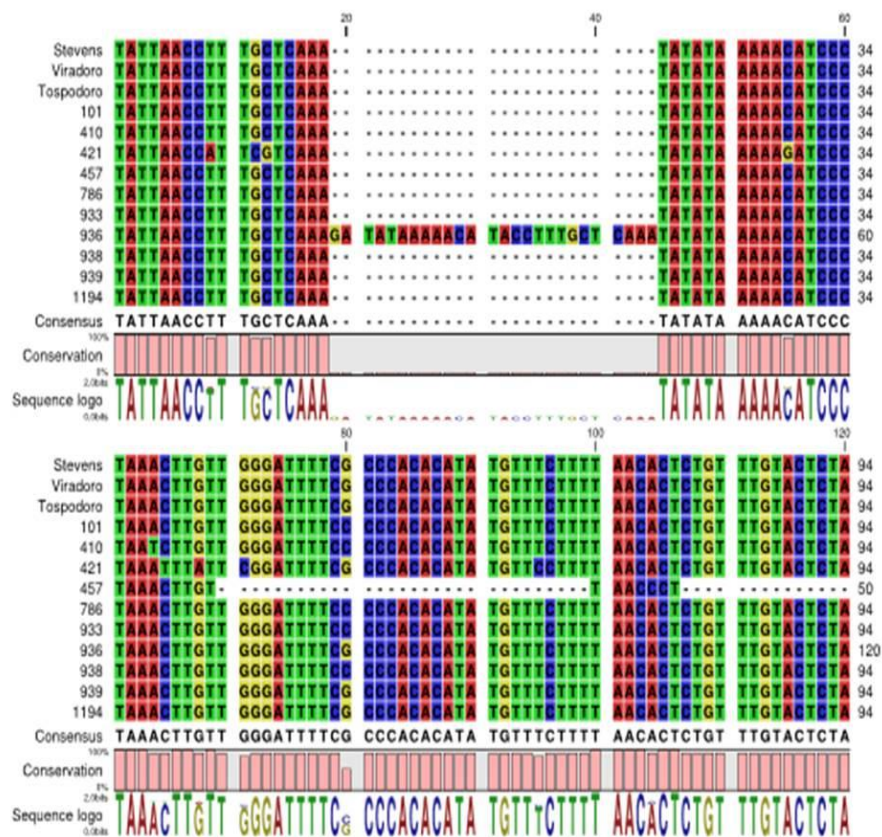
Mutações de ponto foram observadas nos acessos CNPH '101' e '786', inserção no CNPH '933', e eventos de mutação (transição/transversão) e deleção nos acessos CNPH '421' e '1194'. Nos acessos CNPH '938' e '939' ocorreu somente um ponto de transição, o que corrobora o seu alto nível de similaridade com a sequência analisada por Spassova et al. (2001).

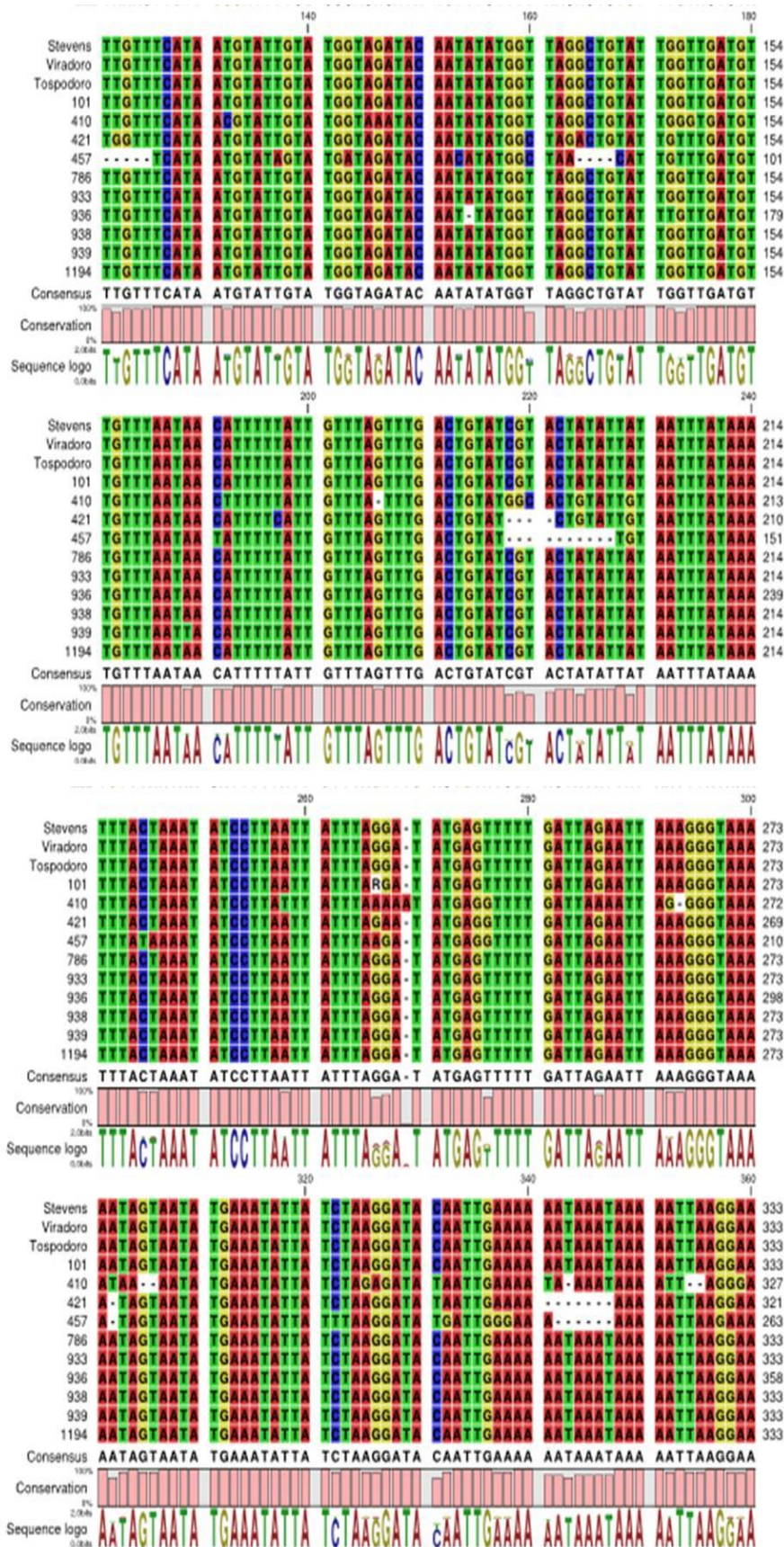
Eventos de recombinação (deleção, inserção e mutações de ponto) são responsáveis pelo polimorfismo genético das vias de transdução de sinais, resultando em diferentes níveis de resistência, que pode ser comprovado através do nível de similaridade da espécie comparando-a com a sequência base da cópia funcional do gene *Sw-5*, e via inoculação mecânica com isolados de tospovírus pela expressão de sintomas ou reação de hipersensibilidade.

A árvore filogenética (Figura 6), realizada pelo método Neighbor-Joining (Mega 6.06), agrupa os acessos CNPH '936', '939', '933', '101', '938' e '1194', e cultivares Viradoro, Tospodoro e Stevens, no mesmo ramo, indicando que pertencem ao mesmo grupo evolucionário, não sendo significativas as diferenças nas sequências destes elementos causadas por eventos de recombinação.

Os demais ramos pertencem a espécies diferentes. O acesso CNPH '786', *S. peruvianum*, apresenta mutações de ponto; CNPH '410', *S. chilense*, possui em sua sequência eventos de deleção, inserção e mutações de ponto; CNPH '421', *S. habrochaites*,

mostrou mutações de ponto e deleção; enquanto que o acesso CNPH ‘457’, Rey de los Tempranos (*S. lycopersicum*), apresenta uma grande deleção. Estes fatos podem justificar o agrupamento desses acessos em outros ramos significativamente representativos, relacionando-os a outros grupos evolucionários.





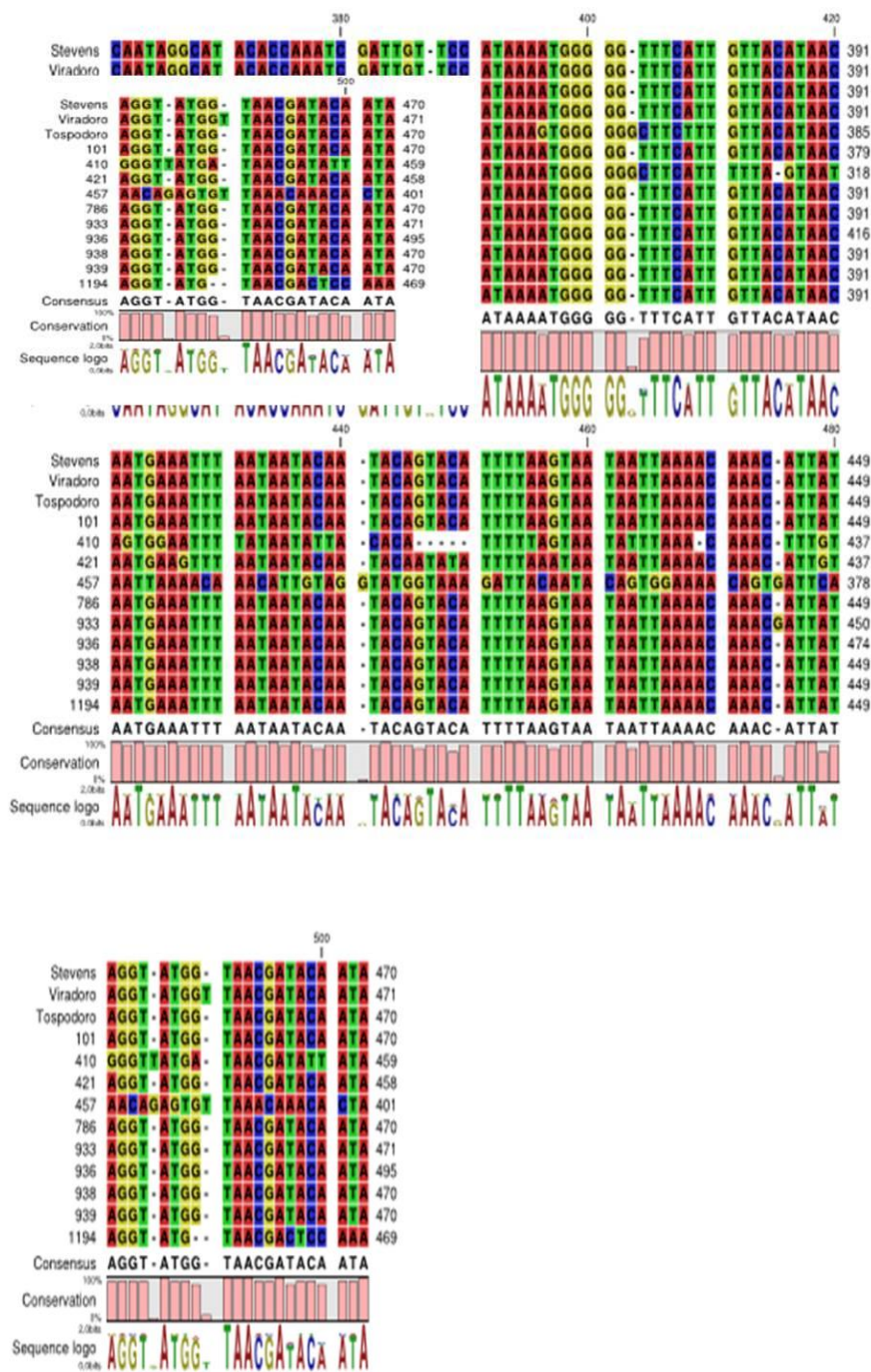


Figura 5. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos acessos CNPH em relação a seqüência base (Stevens). Stevens: Seqüência do gene Sw-5 código NCBI AY007366.1; Viradoro: Acesso comercial resistente à tospovírus da espécie *S. lycopersicum*; Tospodoro: Acesso comercial resistente à tospovírus da espécie *S. lycopersicum*; 101: acesso CNPH espécie *S. peruvianum*; 410: acesso CNPH espécie *S. chilense*; 421: acesso CNPH espécie *S. habrochaites*; 457: acesso CNPH espécie *S. lycopersicum*; 786: acesso CNPH espécie *S. peruvianum*; 933: acesso CNPH espécie *S. peruvianum*; 936: acesso CNPH espécie *S. peruvianum* var. *dentatum*; 938: acesso CNPH espécie *S. corneliomuelleri*; 939: acesso CNPH espécie *S. corneliomuelleri*; 1194: acesso CNPH espécie *S. peruvianum*

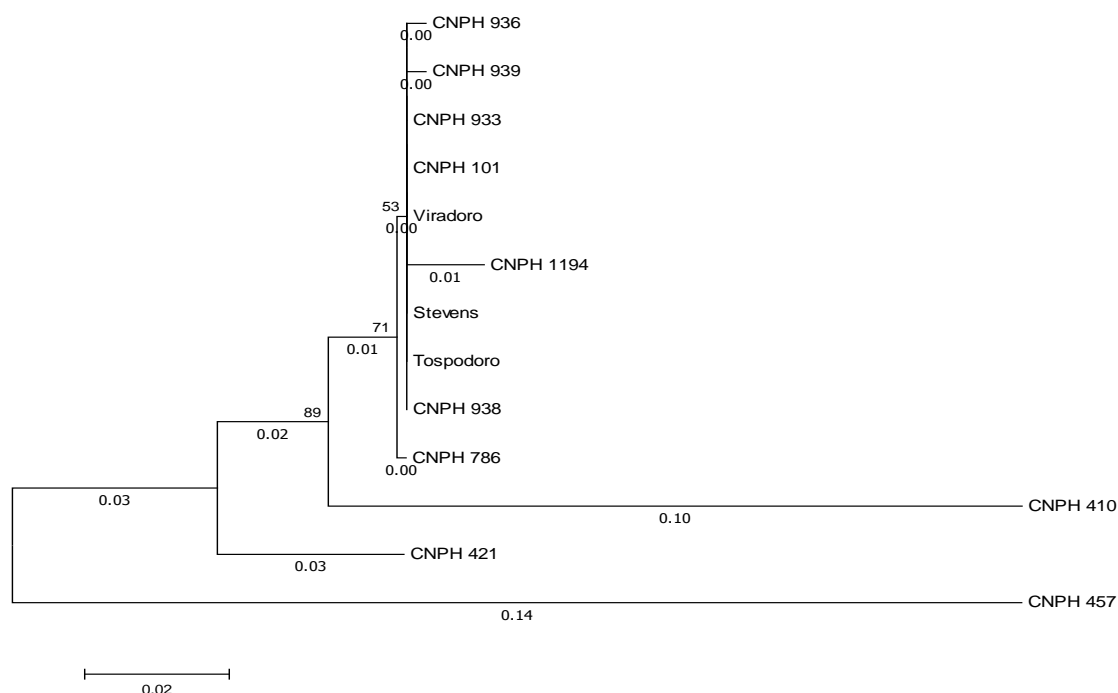


Figura 6. Árvore Filogenética predita pelo alinhamento múltiplo através de Neighbor-joining (Mega 6.06)

O estudo da diversidade de genes de resistência, bem como a organização genômica de tais genes, têm despertado o interesse de diferentes pesquisadores porque tais estudos abrem novas perspectivas para o entendimento da evolução destes genes e para o desenvolvimento de estratégias eficientes para o melhoramento visando resistência a doenças. Nestes estudos, verifica-se que as plantas possuem muitos genes raça- específicos, os quais são mapeados em poucos locos, e que tais locos podem ser constituídos por genes isolados, por genes ligados e organizados de forma sequencial e por genes que contêm diferentes alelos. O número de genes R, bem como o mapeamento de tais genes, têm sido determinados para diferentes patossistemas (Pryor & Ellis, 1993).

Kelly & Miklas (1998) relatam o uso de marcadores moleculares para o mapeamento de genes de resistência em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris L.*). Faleiro et al. (2002) realizaram um estudo de mapeamento de genes de resistência do feijoeiro a diversos fitopatógenos utilizando marcadores RAPD, e analisando a segregação da resistência.

Barbieri & Carvalho (2001) enfatizam a atuação das forças evolutivas no processo de coevolução (ocorre quando uma interação entre dois ou mais organismos produz

uma resposta evolutiva em cada um deles.), gerando variabilidade tanto nas populações de plantas como de fitopatógenos. Através de mutações surgem novos alelos nas populações, os quais sofrem seleção e são rearranjados graças à recombinação genética, havendo dispersão destes alelos quando ocorrem migrações de indivíduos de um local a outro. Segundo Burdon & Silk (1997), a combinação de seleção, deriva genética, migração e mutação define a estrutura genética e a diversidade de todas as populações patogênicas, sendo que o papel relativo de cada um destes fatores pode variar intensamente entre diferentes associações planta/patógeno, entre os estádios do ciclo epidemiológico, e entre associações em ecossistemas naturais ou agrícolas.

Os genes de resistência e os fatores de virulência dos patógenos devem ser sempre estudados, visto que a evolução destes a partir de eventos de recombinação (mutações, deleções e inserções) ocorrem frequentemente como resposta adaptativa das espécies.

Além da identificação de espécies que conferem resistência a determinado patógeno e o estudo evolucionário de genes de resistência, faz-se necessário também realizar a análise de segregação da resistência destas espécies, principalmente quando se trata de espécies selvagens, para obter-se uma fonte confiável de resistência visando a sua introdução em programas de melhoramento.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados descritos no trabalho salientam a importância dos genes de resistência, bem como o uso de marcadores que sejam eficientes na identificação de espécies resistentes/suscetíveis, de fácil uso e reprodutíveis, como os pares de primers aqui utilizados. Observaram-se ampliações diferenciadas em híbridos, o que demanda testes futuros para se confirmar os novos padrões de bandas observados.

Constatou-se a presença do gene *Sw-5*, que confere resistência a tospovirose de ocorrência no tomateiro, em acessos selvagens do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças.

A análise evolucionária apresentou espécies de tomateiros diferentes que conferem resistência ampla às espécies de tospovírus e possuem o gene *Sw-5*, se enquadrando em grupos evolucionários distintos.

Os acessos selvagens das espécies *S. chilense* e *S. habrochaites* que apresentaram padrão de bandas compatível com a resistência podem fornecer alelos diferenciados da fonte de resistência baseada em *S. peruvianum*, já que se agruparam em outros ramos da árvore filogenética, com potencial para contribuir com a manutenção da resistência conferida por *Sw-5*.

Os resultados obtidos por esse trabalho evidenciam a importância de análises evolutivas, apresentando a ocorrência de vários eventos que podem servir de base para a justificativa da evolução adaptativa destes genes.

4 CONFIRMAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A *POTATO VIRUS Y* E *PEPPER YELLOW MOSAIC VIRUS* EM ACESSOS DE ESPÉCIES SELVAGENS DE *SOLANUM* (SECÇÃO *LYCOPERSICON*).

RESUMO

As espécies de *Potyvirus*, *Potato virus Y* (PVY) e *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), tem sido relatadas causando danos severos (qualitativos e quantitativos) à produção de tomate para seus diversos fins. Plantas sintomáticas apresentam clareamento de nervuras, mosqueado e deformação foliar quando infectadas por PVY; e pontos necróticos que podem evoluir até a morte da planta quando infectada por PepYMV. Devido a característica de resistência recessiva a *Potyvirus*, a busca por novas espécies que confirmem resistência genética a potyvirose de ocorrência na cultura do tomateiro é importante. O gene *pot-1*, que confere um padrão de resistência recessiva a potyvirose no tomateiro, tem seu mecanismo regido pela restrição do movimento célula-a-célula da proteína do capsídeo, que impede o acúmulo viral nos tecidos. Fontes de resistência tem sido relatadas em espécies silvestres de *Solanum*, em *S. peruavianum*, *S. chilense*, *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites*, mas se faz necessário avaliar a herança da resistência, já que a resistência relatada é conferida por um gene recessivo monogênico. O presente trabalho teve por objetivo confirmar em acessos selvagens do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças espécies que confirmem resistência múltipla a PVY e PepYMV, tornando-as potenciais candidatas a fontes de resistência para serem utilizadas em programas de melhoramento. Espécies selvagens do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças foram avaliadas para resistência a PVY e PepYMV e identificou-se em acessos das espécies *S. habrochaites* e *S. peruavianum* via análise sorológica (DOT-BLOT) possíveis fontes de resistência.

Palavras-chave: PVY, PepYMV, *pot-1*, resistência múltipla.

ABSTRACT

CONFIRMATION OF MULTIPLE RESISTANCE SOURCES TO *POTATO VIRUS Y* AND *PEPPER YELLOW MOSAIC VIRUS* IN WILD SPECIES ACCESSIONS OF *SOLANUM* (SECTION *LYCOPERSICON*).

The species of *Potyvirus*, *Potato virus Y* (PVY) and *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), have been reported causing severe damage (qualitative and quantitative) to the

production of tomatoes for their various purposes. Symptomatic plants have whitening ribs, mottling and leaf distortion when infected by PVY, and necrotic spots that may progress to death of the plant when infected by PepYMV. Because of the recessive characteristic of the typical resistance to potyvirus, the search for new species that confer genetic resistance to this genus occurring in tomato is important. The *pot-1* gene, which confers resistance to potyviroses in tomato is governed by a restriction mechanism of cell-to-cell movement of the capsid protein, which prevents viral accumulation in tissues. Sources of resistance have been reported in wild *Solanum* species in *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. pimpinellifolium* and *S. habrochaites*, but it is necessary to evaluate the inheritance of this resistance, since the reported resistance is conferred by a monogenic recessive gene. This study aimed to identify in wild species accessions of the Germplasm Bank of Embrapa Hortaliças conferring multiple resistance to PVY and PepYMV, making them candidates for potential sources of resistance for use in breeding programs. Species wild the Germplasm Bank of Embrapa Hortaliças were evaluated for resistance to PVY and PepYMV and identified in accessions of the species *S. peruvianum* and *S. habrochaites* via serological analysis (DOT-BLOT) possible sources of resistance.

Key words: PVY, PepYMV, *pot-1*, multiple resistance.

4.1 INTRODUÇÃO

Os potyvírus são considerados um dos maiores e mais importantes gêneros de vírus de plantas, com 20% das espécies conhecidas, apresentando 146 espécies (Hull, 2002; Fauquet et al., 2005, ICTV, 2014) e são capazes de infectar mais de 2.000 espécies de plantas (Berger et al., 2005).

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

O PVY é a espécie tipo do gênero *Potyvirus* e várias estirpes deste vírus já foram identificadas (Glais et al., 2002). Segundo Janzac et al. (2008b), o PVY é o único potyvirus com distribuição mundial, sendo outras espécies restritas a continentes e/ou países. No Brasil a doença foi observada primeiramente em plantações de batata na década de 40 (Nóbrega & Silberschmidt, 1944) e em pimentão na década de 50 (Costa & Alves, 1950). No início da década de 70, a introdução de cultivares resistentes causou a diminuição da importância deste vírus, apesar dessa resistência ser quebrada com frequência por novos isolados (Nagai, 1983). O uso intenso dessas cultivares levou a seleção e emergência de isolados virulentos

considerados variantes de PVY capazes de suplantarem esta resistência, como o PVY^m, no início da década de 90. Essa estirpe, denominada dessa forma por infectar pimentões da cultivar ‘Magda’, emergiu como nova ameaça a plantios que apresentavam resistência a PVY (Nagai, 1993). Análises baseadas em ELISA direto e do genoma correspondente à região 3’ UTR e da capa protéica, caracterizaram este isolado como sendo uma nova espécie de potyvírus por apresentar baixa relação filogenética com isolados típicos de PVY. Essa nova espécie, denominada *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) por Inoue-Nagata et al. (2002), foi identificada também afetando cultivos de tomate causando perdas de até 100%, como relatado em regiões produtoras do Espírito Santo, mais especificamente em plantios da cultivar Alambra (de Ávila et al., 2004; Maciel-Zambolim et al., 2004). Lucinda et al. (2012) ao sequenciarem o genoma completo de PepYMV constataram que a espécie compartilha apenas 62,07% de identidade na sequência de nucleotídeos em relação a PVY.

Existem diferenças biológicas e genômicas entre isolados de PepYMV de pimentão e de tomate, que vão desde a gama de hospedeiros até intensidade de sintomas e variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos do gene da capa protéica (Cunha et al., 2004). Para se diferenciar isolados de PVY e PepYMV, recomenda-se o uso de *Datura metel*. Essa indicadora apresentará clareamento de nervuras, mosqueado e deformação foliar quando infectada por PVY; e pontos necróticos que podem evoluir até a morte da planta quando infectada por PepYMV (Inoue-Nagata & Resende, 2008).

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

Resistência de plantas a viroses, especificamente a potyvírus são, frequentemente herdadas recessivamente (Provvidenti & Hampton, 1992). Para introgridir resistência à virose, as plantas precisam ser autofecundadas após uma ou duas gerações de retrocruzamento, seguidas de inoculação com o vírus para identificar a resistência, método este que aumenta o tempo para introduzir o alelo recessivo na linhagem de melhoramento.

De acordo com Provvidenti & Hampton (1992), a resistência recessiva acontece com maior frequência para potyvirose (em torno de 40%) do que para outras famílias de vírus (em torno de 20%), nas quais a resistência parece ser predominantemente governada por genes dominantes (Fraiser, 1990), como por exemplo ao TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) (Stevens et al., 1992; Boiteux & Giordano, 1993) e ao CMV (*Cucumber mosaic virus*) (Stamova & Chetelat, 2000) em tomateiro.

A clonagem e a caracterização de genes recessivos que conferem resistência a potyvírus foi realizada em pimentão (Ruffel et al., 2002), alface (Nicaise et al., 2003) e ervilha (Gao et al., 2004), para o *Potato virus Y* (PVY), o *Lettuce mosaic virus* (LMV) e o *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV), respectivamente. Nos três casos, o fator de iniciação da tradução de eucariotos eIF4E foi identificado como o gene de resistência aos potyvírus. Em *Arabidopsis*, três genes (eIF4E1, eIF4E2 e eIF4E3) já foram descritos como associados à resistência recessiva. Assim, o fator eIF4E pode ser considerado como pertencente a uma família de genes que conferem resistência a potyvirose (Robaglia & Caranta, 2006).

Em pimentão e tomate, foi demonstrado que os genes *pot-1* e *pvr2* conferem resistência recessiva completa ao *Potato virus Y* (PVY) e ao *Tobacco etch virus* (TEV), respectivamente (Parrela et al., 2002; Ruffel et al., 2005; Yeam et al., 2007), em razão do mesmo fator de resistência recessiva a potyvirose (fator eIF4E).

O objetivo deste capítulo é revelar acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças que possuam resistência múltipla às espécies de potyvírus (*Potato virus yellow* - PVY e *Pepper yellow mosaic virus* - PepYMV).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do isolado e seleção do material vegetal

Foi utilizado como desafiador o isolado PVY de tomate, Lopes 1, coletado em um dos principais pólos olerícolas do Distrito Federal, o Taquara, e pertencente a coleção da Embrapa Hortaliças. Cento e vinte quatro acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças foram selecionados e analisados previamente para a resistência a PepYMV (Dianese, et al. 2008). Destes, 26 acessos foram comprovadamente resistentes a PepYMV e testados para PVY, e posteriormente re-inoculados com PepYMV.

Todos os materiais foram semeados em bandejas de 128 poços com substrato agrícola (Plantmax®). Cerca de 30 dias após a germinação, quando as plantas apresentavam pelo menos um par de folhas verdadeiras, foram então transplantadas para vasos de 3 litros com solo autoclavado.

4.2.2 Manutenção, preparo do inóculo e inoculação dos acessos

Plantas indicadoras para o PVY foram polvilhadas com carborundum (400 mesh) e inoculadas mecanicamente com o isolado Lopes 1, cerca de 15 dias antes do transplante do material a ser testado. Folhas sintomáticas foram coletadas e maceradas em almofarizes previamente acondicionados no gelo, visando a preservação da infectividade do vírus até o momento da inoculação. O tampão de inoculação continha fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,01 M e sulfito de sódio (Na_2SO_3) 1% (P/V) em água destilada. A proporção de tecido vegetal/tampão usada foi de 1:10.

Todos os acessos foram polvilhados com carborundum (400 mesh) e todas as folhas foram inoculadas mecanicamente com a preparação feita a partir de folhas sintomáticas de tomateiro Santa Clara usadas como inóculo. Em seguida, o experimento foi irrigado para se retirar o excesso de carborundum e evitar a queima das folhas. Aproximadamente 48 horas depois, foi realizada uma segunda inoculação seguindo o mesmo método. Dessa forma reduziu-se significativamente o nível de escape, como recomendado por Boiteux & de Ávila (1994). Os mesmos procedimentos foram realizados para a inoculação com PepYMV.

4.2.3 Confirmação da infecção a PVY e PepYMV via DOT-BLOT

Todos os acessos foram avaliados através de DOT-BLOT, seguindo o protocolo pré-estabelecido. As amostras sintomáticas e controles negativos foram coletados e macerados com a adição de tampão ½ PBS, e posteriormente, 4µl dessa solução foram aplicados em membrana de nitrocelulose. As amostras foram colocadas para secar por 30 minutos e depois colocadas em tampão de bloqueio, contendo ½ PBS + 2% de leite em pó desnatado em agitador por 2 horas. Em seguida, diluiu-se o conjugado IgG em ½ PBS, incubou-se as membranas por uma noite a 4°C, e lavou-se as membranas três vezes por três minutos com tampão ½ PBS em agitador. Para executar o processo de revelação das membranas, o conjugado geral foi diluído em ½ PBS suficiente para cobrir as membranas e

colocados em agitação por duas horas. As membranas foram então lavadas com ½ PBS três vezes por três minutos e colocadas para secar.

4.2.4 Extração de RNA, e identificação da resistência múltipla a PepYMV e PVY por RT-PCR

O RNA de todos os acessos inoculados com PVY e PepYMV foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Plant Minikit (Qiagen®) a partir do protocolo estabelecido pelo fabricante para isolamento de pequena escala de RNA. A síntese de cDNA para cada amostra foi realizada, a partir do uso da transcriptase reversa MMLV-RT (Invitrogen®) e o primer OligodT 50 µl (Invitrogen®), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Os primers utilizados na reação de PCR foram os primers degenerados para potyvírus PY11 (F = 5'-GGNAAYAAAYAGYGGNCARCC-3') e M10 (R = 5' AAGCAGTGTTATCAACGCAGA-3'), descritos por Chen et al. (2001).

A reação de PCR com os cDNAs previamente sintetizados foi realizada nas seguintes proporções: 1 µl de cDNA, 1,0 µl de tampão 10X, 0,8 µl de 50 mM MgSO₄, 0,10 µl de cada primer, 0,8 µl dNTP, 0,10 µl Taq DNA e água mili-Q para um volume final de 10 µl. Todas as reações foram realizadas em um termociclador Biocycler (Biosystem) seguindo-se o programa: desnaturação a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos na fase de anelamento compostos por 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 3 minutos. Todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acessos CNPH previamente avaliados por Dianese et al. (2008) para PepYMV, foram inoculados com PVY e avaliados via DOT-BLOT para a verificação da ocorrência de acessos resistentes ou suscetíveis à essa espécie (Tabela 2).

Os acessos CNPH '0798', '1121', '1122' e '1288' apresentaram sorologia negativa em DOT-BLOT, assim como a total ausência de sintomas, sendo considerados resistentes a PVY. Estes genótipos foram re-inoculados com um isolado de PepYMV (Tabela 3) para avaliar se estes acessos são resistentes a essa espécie de *Potyvirus*.

A Identificação de fontes de resistência a doenças e o conhecimento do controle genético da resistência é um dos primeiros passos de um programa de melhoramento

genético visando à obtenção de cultivares resistentes (Juhász et al., 2008). No melhoramento genético do tomateiro, a maioria dos genes de resistência a patógenos atualmente empregados tem sido transferidos via cruzamentos com espécies silvestres (Doganlar et al., 1997, Vidavsky & Czosnek, 1998). Destas, *S. peruvianum* é considerada uma das mais importantes fontes doadoras de genes de resistência a doenças bem como de outras características de interesse agrônomo e nutricional (Stevens & Rick, 1986). Além desta espécie silvestre, *S. habrochaites*, a espécie que apresentou melhores resultados nesse estudo, também têm sido utilizado como fonte doadora de resistência, mais especificamente de resistência recessiva para potyviroses (Parrella et al., 2002).

Devido ao fato da resistência a essas potyviroses ser mediada por um gene de resistência recessivo é necessário avaliar a herança da resistência, assim como fizeram Legnani et al. (1995), utilizando um acesso de *S. habrochaites* como genitor resistente, que não demonstrou qualquer sintoma durante as avaliações; porém, todas as plantas F1 desenvolveram sintomas, assim como o genitor suscetível.

Para potyviroses, a resistência recessiva é mais comum do que em outras famílias de vírus, chegando a aproximadamente 50% dos genes de resistência identificados e caracterizados (Robaglia & Caranta, 2006). Esta resistência pode estar relacionada com a perda de fatores essenciais para a multiplicação do vírus na planta hospedeira (Diaz-Pendon et al., 2004; Robaglia & Caranta, 2006).

Tabela 2. Acessos CNPH avaliados via DOT-BLOT para resistência a PVY após inoculação mecânica com um isolado deste vírus

Acesso CNPH	Nome comum	Espécie	Positivas em DOT-BLOT*
46	Angela Hiper	<i>S. lycopersicum</i>	8/9
201	LA444-1	<i>S. peruvianum</i>	2/6
202	Angela Gigante	<i>S. lycopersicum</i>	7/9
382	PI 732293	<i>S. pimpinellifolium</i>	16/24
410	LA 1967	<i>S. chilense</i>	3/9
416	PI126445	<i>S. habrochaites</i>	8/9
420	PI127826	<i>S. habrochaites</i>	8/9
421	PI127827	<i>S. habrochaites</i>	6/9
787	CGO6714	<i>S. habrochaites</i>	8/9
798	LA1616	<i>S. peruvianum</i>	0/9
928	WYR3951	<i>S. habrochaites</i>	8/9
946	TX407	<i>S. peruvianum</i>	3/9
981	LA462	<i>S. peruvianum</i>	9/9
1033	-	<i>S. corneliomuelleri</i>	6/6
1037	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	9/9
1121	L.03683	<i>S. habrochaites</i>	0/23
1122	L.03684	<i>S. habrochaites</i>	0/19
1238	LA1963	<i>S. chilense</i>	5/9
	LA372		
1249	(97L7524)	<i>S. peruvianum</i>	7/9
1277	PI 128660	<i>S. peruvianum</i>	7/9
1287	PI126445	<i>S. habrochaites</i>	7/9
1288	PI247087	<i>S. habrochaites</i>	0/9
1290	PI126449	<i>S. habrochaites var glabratum</i>	7/7
1434	LA0103	<i>S. peruvianum</i>	2/9
-	Ponderosa	<i>S. lycopersicum</i>	9/9
-	Datura	<i>Datura metel</i>	2/2

*Número de plantas positivas em DOT-BLOT sobre número de plantas inoculada.

Tabela 3. Acessos CNPH avaliados via DOT-BLOT para resistência a PepYMV

Acesso CNPH	Nome comum	Espécie	Positivas em DOT-BLOT*
798	LA1616	<i>S. peruvianum</i>	0/15
1121	L.03683	<i>S. habrochaites</i>	0/16
1122	L.03684	<i>S. habrochaites</i>	0/15
1288	PI247087	<i>S. habrochaites</i>	0/16
-	Fisalis	<i>Physalis sp.</i>	1/1
-	Pimenta	<i>Capsicum sp.</i>	1/1

*Número de plantas positivas em DOT-BLOT sobre número de plantas inoculadas.

Os quatro acessos que não apresentaram reação em DOT-BLOT, sendo considerados como fontes de resistência a PVY e PepYMV, e com grande potencial para serem utilizados como fontes de resistência múltipla, foram analisados molecularmente com um par de primers universais degenerados ‘PY11’ e ‘M10’, que amplificam bandas de aproximadamente 1.7 kb, correspondendo à regiões conservadas do capsídeo viral, via RT-PCR para se verificar se ocorre a acumulação viral mesmo não apresentando reação nos ensaios sorológicos. Os resultados obtidos sugerem que o ensaio deve ser submetido à mais uma repetição para geração de resultados mais confiáveis, pois os controles positivos para o inóculo de PVY (cDNA de planta da espécie *Datura metel* inoculada) e para o inóculo de PepYMV (cDNA de planta da espécie *Capsicum sp.* inoculada) não apresentaram ampliações quando visualizados em gel de agarose 1,5%. Somente o controle positivo inoculado em *Physalis sp.* com PepYMV apresentou um amplicon de aproximadamente 1.7 kb (Figura 7). As prováveis causas apontadas para este problema são a contaminação com enzimas que degradam o RNA (advindas do material genômico da planta) que resultam em baixa concentração do RNA.

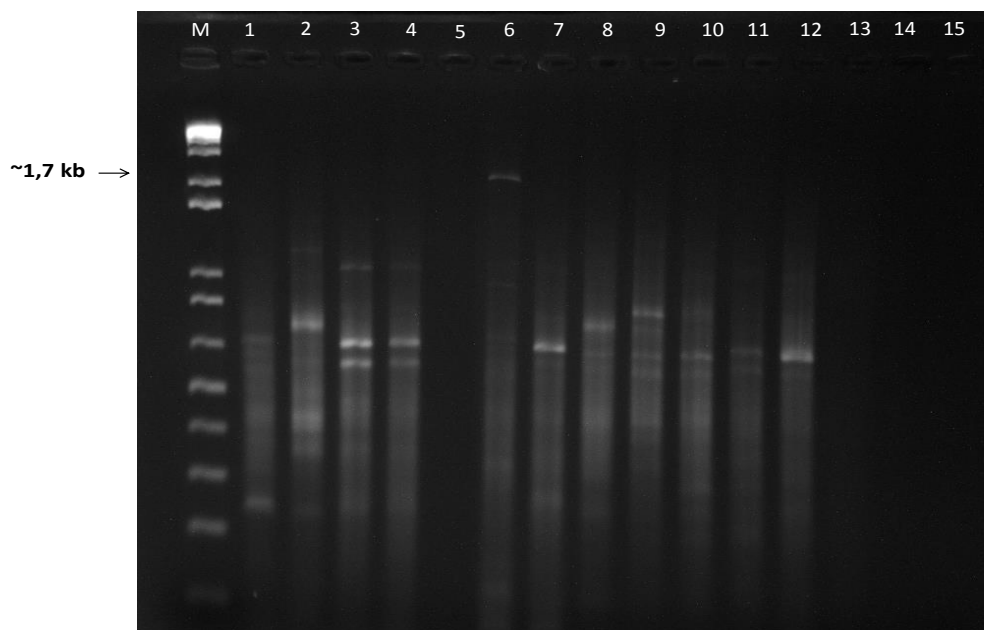


Figura 7. Perfil de amplificação do cDNA dos acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças inoculados com espécies do gênero *Potyvirus* visualizados em gel de agarose 1,5%. M = marcador 1 kb (Invitrogen); 1 = *Datura sp.* inoculada com PVY; 2 = CNPH '798' inoculado com PVY; 3 = CNPH '1121' inoculado com PVY; 4 = CNPH '1122' inoculado com PVY; 5 = CNPH '1288' inoculado com PVY; 6 = *Capsicum sp.* inoculada com PepYMV; 7 = *Physalis sp.* inoculada com PepYMV; 8 = CNPH '0798' inoculado com PepYMV; 9 = CNPH '1121' inoculado com PepYMV; 10 = CNPH '1122' inoculado com PepYMV; 11 = CNPH '1288' inoculado com PepYMV; 12 = Tomate Santa Clara não inoculado; 13 = Controle negativo da reação do cDNA; 14 = Controle negativo da reação do cDNA; 15 = Controle negativo da reação de PCR

De acordo com Gehrig et al. (2000) a extração de RNA de alta qualidade é necessária para fazer bibliotecas de cDNA, isolar genes por RT-PCR ou investigar perfis de expressão gênica. Vários métodos são normalmente utilizados para o isolamento de RNA (Chomczynski e Sacchi, 1987; Chirgwin et al, 1979;. Han et al, 1987) e cada um destes métodos pode ser modificado para ser aplicável a uma determinada espécie de planta (Gruffat, 1998). No entanto, tecidos de plantas com níveis elevados de compostos fenólicos e/ou polissacáridos resultam em um baixo rendimento ou qualidade ruim do RNA. Os compostos fenólicos podem sofrer oxidações e realizar ligações covalentes com quinonas, e ligar-se a ácidos nucleicos (Loomis, 1974), enquanto que os polissacáridos podem coprecipitar com o RNA em baixa força iônica, resultando na ausência de RNA, o que pode justificar a ausência de amplificação dos controles positivos utilizados nesse trabalho.

Baseado na análise sorológica negativa dos materiais e total ausência de sintomas, é possível afirmar que estes são acessos que possuem resistência múltipla à PVY

e PepYMV, e que a espécie *S. habrochaites* é um potencial candidato a fontes de resistência para programas de melhoramento, já que nesta espécie também é possível encontrar o gene de herança recessiva *pot-1*. A espécie *S. peruvianum*, relatada pela primeira vez como sendo resistente a PepYMV por Dianese et al. (2008), é também uma alternativa promissora de resistência múltipla a potyviroses, sobressaindo à *S. habrochaites* por ser a fonte inicial e mais importante de resistência a tospovírus.

Juhász et al. (2008) afirma que foi possível selecionar apenas uma fonte de resistência originada de um acesso silvestre de tomateiro da espécie *S. habrochaites* dentre os 21 acessos testados, e que apesar deste acesso apresentar várias características de planta e fruto muito diferenciadas dos tipos cultivados comercialmente, possui facilidade de intercruzamento com *S. lycopersicum*, representando uma fonte promissora para ser empregada em programas de melhoramento genético de tomateiro visando o desenvolvimento de cultivares resistentes ao PepYMV. Lourenção et al. (2005) analisaram linhagens avançadas do programa de melhoramento do tomateiro do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e cultivares para a resistência a TCSV (espécie de tospovírus predominante na área experimental) e PVY, e constatou que todos os materiais testados eram apenas tolerantes às duas espécies de vírus, devido a baixa porcentagem de expressão de sintomas e infecção quando analisados sorologicamente, não encontrando assim fontes seguras de resistência múltipla a esses fitopatógenos. Isso mostra que as fontes de resistência aqui descritas tem potencial de fornecimento de material genético para programas que visam o desenvolvimento de tomateiros resistentes, com aparente imunidade aos isolados de PVY e PepYMV utilizados.

A resistência múltipla, como a detectada nos materiais analisados neste trabalho, é a forma ideal de controle, diminuindo-se assim o uso de produtos químicos. Giordano et al. (2010) desenvolveram uma cultivar ('BRS Tospodoro') derivada de um programa de retrocruzamentos entre a cultivar 'Viradoro' (usada como parental recorrente) e a linhagem 'CNPH 1306' (fonte doadora do gene *Pto* que controla resistência à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* raça 0) que apresenta múltiplos genes de resistência a patógenos. 'BRS Tospodoro' apresenta ainda o gene *Mil-2* que condiciona resistência a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, bem como tolerância para populações do pulgão (vetor de *Potyvirus*) e da mosca-branca (*Bemisia tabaci*); possui o gene *Sw-5b*, que confere resistência a quatro espécies de *Tospovirus*. Esta cultivar também é resistente aos fungos

Stemphylium solani e *S. lycopersici* (gene *Sm*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1 (gene *I-1*) e *Verticillium dahliae* raça 1 (gene *Ve*).

Silveira et al. (2005) relataram a seleção de acessos e progênies resistentes a duas espécies de potyvírus, porém em curcubitáceas, sendo pertinente a busca por acessos que apresentem resistência múltipla mesmo que em outras famílias de plantas, com potencial de uso destes alelos via transgenia.

4.4 CONCLUSÃO

A identificação de fontes de resistência múltipla para potyvirose (PVY e PepYMV) em tomateiro ainda não foi relatada, mas sabe-se que a espécie *S. habrochaites* é fonte doadora do gene recessivo *pot-1*, que nos acessos analisados pode potencializar ou ser responsável pela resposta de resistência observada.

Espécies selvagens do Banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças foram avaliadas para resistência a PVY e PepYMV e identificou-se em acessos das espécies *S. habrochaites* e *S. peruvianum* via análise sorológica (DOT-BLOT) possíveis fontes de resistência.

Para verificar se há acúmulo viral, mesmo em sorologia negativa, faz-se necessário reavaliar molecularmente os acessos inoculados com isolados de ambos os vírus via RT-PCR com os “primers” degenerados para *Potyvirus* (‘PY11’ e ‘M10’) que são eficientes para a detecção.

Além dos resultados sorológicos e da análise molecular, é necessário também estudos da herança genética, já que o gene que confere resistência a PepYMV e PVY é recessivo monogênico, visando a obtenção de fontes confiáveis e promissoras para compor programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares comerciais com resistência às potyvirose aqui estudadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tomateiro é uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo, e por esse motivo torna-se altamente vulnerável ao ataque de pragas e fitopatógenos, sendo as doenças de origem viral responsáveis por perdas consideráveis na produção da cultura.

Entre as doenças de etiologia viral estão as tospoviroses e potyviroses, e o método mais eficiente de controle é a utilização de cultivares resistentes. Acessos das espécies *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. chilense* e *S. corneliomuelleri* para tospovírus; e acessos das espécies *S. peruvianum* e *S. habrochaites* para potyvírus, constituem-se como fontes de resistência e podem ser introgridas em programas de melhoramento, utilizando-se de melhoramento convencional ou transgenia.

Análises evolucionárias do gene dominante que confere resistência a tospovírus, o gene *Sw-5*, são úteis para verificar as evoluções adaptativas das espécies que possuem este gene.

Espécies que apresentam resistência múltipla a PVY e PepYMV ainda não foram relatadas, e a identificação e confirmação via análise molecular destas espécies é um importante passo para que sejam utilizadas em programas de melhoramento, já que serão obtidas fontes confiáveis de resistência.

6 REFERÊNCIAS

ASHFIELD, T.; ONG, L.E.; NOBUTA, K.; SCHNEIDER, C.M. & INNES, R.W. Convergent evolution of disease resistance gene specificity in two flowering plant families. **Plant Cell**, Waterbury, v. 16, p. 309–318, 2004.

ARAMBURU, J. & MARTI, 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**, Oxford, v. 52, p. 407, 2003.

ARAUJO, M.T.; ÁVILA, A.C. de; CUPERTINO, F.P. & MALUF, W.R. *L. hirsutum* nova fonte de resistência ao vírus do vira-cabeça (TSWV). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 23. **Resumos**. Rio de Janeiro, 1983. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Olericultura, p. 164, 1983.

ATREYA, P.B; ATREYA, C.D; PIRONE, T.P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences USA**, Boston, n. 88, p-7887-7891, 1991.

ATREYA, C.D., ATREYA, P.L., THORNBURY, D.W., PIRRONE, T.P. Site-directed mutations in the potyvirus HC-PRO gene affect helper component activity, virus accumulations, and symptom expression in infected tobacco plants. **Virology**, New York. v.191, p.106- 111, 1992.

ATREYA, P.B; LOPEZ-MOYA,J.J.; CHU, M.; ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyviral transmission by aphids. **Journal of General Virology**, London, n.76, p. 265-270, 1995.

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

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. 2 ed. Goiânia: Editora UFG, 2008, 536 p.

BARBIERI, R.; CARVALHO, F.I.F. Coevolução de plantas e fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7 n. 2, p. 79-83, 2001.

BARBOSA, J. C., L. D. D. TEIXEIRA and J. A. M. REZENDE. First Report on the Susceptibility of Sweet Pepper Crops to Tomato chlorosis virus in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 374, 2010.

BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B. & DINESHKUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, New York, v. 276, p. 726-733, 1997.

BELKHADIR, Y., SUBRAMANIAM, R. & DANGL, J.L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, 7:391-399, 2004.

BENDAHMANE, A., KANYUKA, K. & BAULCOMBE, D.C. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. **Plant Cell**, Waterbury, v. 11, p. 781-791, 1999.

BERGER, P.H., ADAMS, M.J., BARNETT, O.W., BRUNT, A.A., HAMMOND, J., HILL, J.H., JORDAN, R.L., KASHIWAZAKI, S., RYBICKI, E.P., SPENCE, N., STENGER, D.C., OHKI, S.T., UYEDA, I., VAN ZAAZEN, A., VALKONEN, J.P. & VETTEN, H.J. Family Potyviridae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) **Virus taxonomy**. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego. 2005. pp.819-841.

BEZERRA, I. C., R. O. RESENDE, L.; POZZER, T.; R. KORMELINK. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from *Chrysanthemum* and one from zucchini. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 11, p. 823-830, 1999.

BINNECK, E., NEDEL, J.L., DELLAGOSTIN, O.A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: Uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 183-196, 2002.

BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L. de B.; ÁVILA, A.C. de & SANTOS, J.R.M. 'TSW-10': linhagem de tomate para mesa resistente a três espécies de tospovírus causadores do "vira-cabeça". **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 163-164, 1993.

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

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

BOITEUX, L.S., FONSECA, M.E.N. & SIMON P.W. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, p. 32-38, 1999.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p.314-331, 1980.

BROMMONSCHENKEL, S.H.; TANSKLEY, S. D. Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. **Molecular Genetics**, Berlin, v. 256, p. 121-126, 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 Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, p. 1130-1138, 2000.
- BUCHER, E. et al. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 2, p. 1329-36, 2003.
- BURDON, J.J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 87, p. 664-669, 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 Sciences USA**, Boston, v. 96, p. 302–306, 1999.
- CAIXETA, E.T., OLIVEIRA, A.C.B., BRITO, G.G., SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: Borém, A., Caixeta, E.T. (eds.) **Marcadores Moleculares**. Viçosa, p. 9-78, 2006.
- CARELLI, B.P. **Estimativa de variabilidade genética em acessos crioulos e cultivares comerciais de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. 2003. Tese (Doutorado em Ecologia e recursos Naturais) - São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, 100p. 2003.
- CANADY, M.A., STEVENS, M.R., BARINEAU, M.S. & SCOTT, J.W. Tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. **Euphytica**, Wageningen, v. 117, p. 19-25, 2001.
- CHAGUE, V.; MERCIER, J.C.; GUENARD, M.; deCOURCEL, A.; VEDEL, F. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 1045–1051, 1996.
- CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M.J. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of Virology**, New York, v. 146, p. 757-766, 2001.
- CHILD, A. A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (G. Don) D'Arcy section *Tuberarium* (Dun.) Bitter (s.l.). **Feddes Repertorium**, Berlin, v. 101, p. 209-235, 1990.
- CHHIRGWIN, J.M.; PRYZBILA, A.E.; MACDONALD, R.J.; RUTTER, W.J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry**, Washington, v. 18, p. 5294-5299, 1979.
- CHO, J.J., CUSTER, D.M., BROMMONSCHENKEL, S.H. & TANKSLEY, S.D. Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to tomato spotted wilt virus in vegetables. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 431, p. 367-378, 1996.

- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 162, p. 156-159, 1987.
- CIUFFO, M., FINETTI-SIALER, M.M., GALLITELLI, D. & TURINA, M. First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw5* resistance gene. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, p. 56, 2005.
- COLARICCIO, A., M.; EIRAS, A. L. R.; CHAVES, A. L.; LOURENÇÃO, A. M. T. Detecção do *Chrysanthemum stem necrosis virus* em tomateiro no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 26, p. 252-254, 2000.
- COLARICCIO, A., EIRAS, M., CHAVES, A.L.R., ROGGERO, P. & CHAGAS, C.M. Diversidade de tospovírus em diferentes regiões produtoras de olerícolas do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 27, p. 177-182, 2001.
- COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas- 1 insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 103-167, 1998.
- COSTA, A.S., ALVES, S. Mosaico do pimentão. **Bragantia**, Campinas v.10, p.95-96, 1950.
- COSTA, A. S., & R. FOSTER. A transmissão mecânica de vira-cabeça por fricção com suco. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 13, p. 249-262, 1938.
- CUNHA, L.C.V., RESENDE, R.O., NAGATA, T. & INOUE-NAGATA, A.K. Distinct features of *Pepper yellow mosaic virus* isolates from tomato and sweetpepper. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 663-667, 2004.
- DANGL, J. L., JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v. 411, p. 826-833, 2001.
- DAROS, J.A., CARRINGTON, J.C. RNA binding activity of Nia proteinase of Tobacco etch potyvirus. **Virology**, New York, v.237, p.327-336, 1997.
- DE ÁVILA, A. C. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 179-183, 1993.
- DE ÁVILA, A.C., INOUE-NAGATA, A.K., COSTA, H., BOITEUX, L.S., NEVES, L.O.Q., PRATES, R.S. & BERTINI, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 655-658, 2004.
- DIANESE E.C., RESENDE R.O., INOUE-NAGATA A. K. Alta incidência de Pepper yellow mosaic vírus em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 67-68, 2008.

DIANESE E.C.; FONSECA, M. E. N.; INOUE-NAGATA, A. K.; RESENDE, R. O.; BOITEUX L. S. Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species. **Euphytica**, Wageningen, v. 180, p. 307-319, 2011.

DIANESE, E. C.; FONSECA, M. E. N.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, R.; INOUE-NAGATA, A. K.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L. S. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, p. 133-142, 2010.

DIAZ-PENDON, J.A.; TRUNIGER, V.; NIETO, C.; GARCIA-MAS, J.; BENDAHMANE, A.; ARANDA, M. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, p. 223-233, 2004.

DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANSKESLEY, S.D. Production of interespecific F1 hybrids, BC1, BC2 and BC3 populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of peruvianum carrying new root-knot nematode resistance genes. **Euphytica**, Wageningen, v. 95, p. 203- 207, 1997.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, p. 185-209, 2004.

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., BROMMONSHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 59-66, 2003.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) Virus taxonomy. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, San Diego. 1259p., 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM **Documento** 20, 220 p. 1996.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEM. **Documentos**, 20).

FEYS, B. J.; PARKER, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends Genetics**, London, v. 16, n. 10, p. 449-455, 2000.

FINLAY, K. W. Inheritance of spotted wilt resistance in tomato. I. Identification of strains of the virus by the resistance or susceptibility of tomato species. **Australian Journal of Scientific Research**, Melbourne, v. 5, p. 303-314, 1952.

FINLAY, K. W. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 6, p. 153-163, 1953.

FOSBERG, F.R. New nomenclatural combination for Galapagos plant species. **Phytologia**, Huntsville, v. 62, p. 181-183, 1987.

FREITAS, L.B., BERED, F. **Genética e Evolução vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 463p. 2003.

GAO, Z., JOHANSEN, E., EYERS, S., THOMAS, C.L., NOEL ELLIS, T.H. & MAULE, A.J. The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. **Plant Journal**, Oxford, v. 40, p. 376-385, 2004.

GARLAND, S.; SHARMAN, M.; PERSLEY, D.; McGRATH, D. The development of an improved PCR-based marker system for Sw-5, an important TSWV resistance gene of tomato. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 56, p. 285-289, 2005.

GEHRIG, H.H.; WINTER, K.; CUSHMAN, J.; BORLAND, A.; TAYBI, T. An Improved RNA Isolation Method for Succulent Plant Species Rich in Polyphenols and Polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 18, p. 369-376, 2000.

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

GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J. Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 15, p. 7601-7612, 2008.

GLAIS, L.; KERLAN, C.; ROBAGLIA, C. Variability and evolution of *Potato virus Y*. the type species of the *Potyvirus* genus. In: **Plant viruses as a molecular pathogens**, New York, p. 225-253, 2002.

GIORDANO, L. de B.; LIMA, M.I.; RESENDE, R. de O.; FERRAZ, E. & ÁVILA, A.C. de. Developing tomato cultivars with resistance to tospovirus. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS IN FLORAL AND VEGETABLE CROPS, 4., Wageningen, 1998. **Abstracts**, Wageningen, 1998. p.97.

GIORDANO, L.B.; SILVA, C. Hibridação em tomate. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p.463-480.

GIORDANO, L.B. & RIBEIRO, C.S. Origem, botânica e composição química do fruto. In: Silva, J.B.C. & Giordano, L.B. (Eds.) **Tomate para processamento industrial. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**. Brasília, p. 12-17, 2000.

GIORDANO LB; BOITEUX LS; QUEZADO-DUVAL AM; FONSECA MEN; RESENDE FV; REIS A; GONZÁLEZ M; NASCIMENTO WM; MENDONÇA JL. 'BRS

Tospodoro': a high lycopene processing tomato cultivar adapted to organic cropping systems and with multiple resistance to pathogens. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 241-245, 2010.

GIORIA, R. *et al.* Breakdown of resistance in sweet pepper against *Pepper yellow mosaic virus* in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 2, 2009.

GORDILLO, L.F.; STEVENS, M.R.; MILLARD, M.A.; GEARY, B. Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to *Tomato spotted wilt virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 694-704, 2008.

GRANT, M.R., GODIARD, L., STRAUBE, E., ASHFIELD, T., LEWALD, J., SATTLER, A., INNES, R.W. & DANGL, J.L. Structure of the Arabidopsis *RPML1* disease resistance. **Science**, New York, v. 269, p. 843-846, 1995.

GREENBERG, J. T.; YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 201-211, 2004.

GRUFFAT, D. Isolation of RNA from mammalian cells: application to large mRNA. In: Siebert PD and Larrick JW (eds), Gene cloning and analysis by RT-PCR. **BioTechniques**, Natick, v. 23, p. 35-55, 1998.

GURR, S. J.; RUSHTON, P. J. Engineering plants with increased disease resistance: What are we going to express? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 275-282, 2005.

HAMMOND-KOSACK, K.E. & JONES, J.D.G. Resistance genedependent plant defense responses. **Plant Cell**, Waterbury, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Response to plant pathogens. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants, ed. B. Buchanan, D. Grissem, R. Jones, Rockville, MD: Am. Soc. **Plant Physiology**, Bethesda, p.1102-1556, 2000.

Han J.H.; Stratowa, C.; Rutter, W. J. Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. **Biochemistry**, Washington, v. 26, p. 1617-1625, 1987.

HARI, V.; SIEGEL, A.; ROZEK, D.; TIMBERLAKE, W.E. The RNA of *Tobacco etch virus* contains Poly (A). **Virology**, New York, v.92, p.568-571, 1979.

HERRERO, S., CULBREATH, A.K., CSINOS, A.S., PAPPU, H.R., RUFTY, R.C. & DAUB, M.E. Nucleocapsid gene-mediated transgenic resistance provides protection against *Tomato spotted wilt virus* epidemics in the field. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 139-147, 2000.

HOLMES, F.O. Resistance to spotted wilt in tomato. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 38, p. 467-473, 1948.

HOGENHOUT, S.A., AMMAR, E.D., WHITFIELD, A.E. & REDINGBAUGH, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 327-359, 2008.

HUISKONEN, J. T. et al. Electron Cryotomography of Tula Hantavirus Suggests a Unique Assembly Paradigm for Enveloped Viruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, n. 10, p. 4889-4897, 2010.

HULL, R. Matthews' Plant Virology. 5th Ed. Amsterdam. **Elsevier Academic Press**. 2002.

HUTCHESON, S.W. Current concepts of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 59-90, 1998.

IBGE, 2012 **Levantamento Sistemático da Produção**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201206.pdf> Acesso em 15 de julho de 2012.

INOUE-NAGATA, A. K., FONSECA, M.E.N., RESENDE, R.O.; BOITEUX, L.S.; MONTE, D.C.; DUSI, A.N.; ÁVILA, A.C. de; VLUGT, R.A.A. van der. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**, New York, v.147, p.849-855, 2002.

INOUE-NAGATA, A.K. & RESENDE, R.O. *Pepper yellow mosaic virus*. In: Rao, G.P., Kumar, P.L. & Holgun-Peña, R.J. Characterization, Diagnosis & Management of Plant Viruses. Vol. 3: **Vegetable and Pulse Crops**, Texas, p. 195-202, 2008.

LEGNANI, R.; SELASSIE, G.; WOMDIM, R.N.; GOGNALONS, P.; MORETTI, A. Evaluation and inheritance of the *Lycopersicon hirsutum* resistance against potato virus Y. **Euphytica**, Wageningen, v.86, p.219-226, 1995.

LELLIS, A.D., KASSCHAU, K.D., WHITHAM, S.A. & CARRINGTON, J.C. Loss of susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. **Current Biology**, London, v. 12, p. 1046-1051, 2002.

LÉONARD, S.; PLANTE, D. *et al.* Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, p. 7730-7737, 2000.

LEWANDOWSKI, D.J.; ADKINS, S. The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. **Virology**, New York, v. 342, p. 26-37, 2005.

LI, W. Characterization of Tomato spotted wilt virus NSm protein domains involved in tubule formation, movement and symptoms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 6, p. S71-S72, 2009a.

LINNAEUS. C. **Species Plantarum**, 1 st cd. Holmiae. Stockholm. 1753.

- LOOMIS, W.D. Overcoming problems of phenolic and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, New York, v. 31, p. 528-545, 1974.
- LOPES, C. A.; de ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brazil. 2005.
- LOPEZ, C. et al. Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. **Journal of General Virology**, London, v. 92, n. 1, p. 210-215, 2011.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H.; SIQUEIRA, W.J.; USBERTI FILHO, J.A. & MELO, A.M.T. de. Seleção de tomateiros resistentes a tospovírus. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 1, p. 21-31, 1997.
- LOURENÇÃO, A. L., H. NAGAI, W. J. SIQUEIRA, A. M. T. MELO, J. A. U. FILHO. Seleção de tomateiros resistentes a tospovírus. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 293-303, 1999.
- LOURENÇÃO AL; SIQUEIRA WJ; MELO AMT; PALAZZO SRL. Resistência de cultivares e linhagens de tomateiro a *Tomato chlorotic spot virus* e a *Potato virus Y*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 609-614, 2005.
- LUCINDA, N.; ROCHA, W.B.; INOUE-NAGATA, A.K. & NAGATA, T. Complete genome sequence of pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 157, p. 1397–1401, 2012.
- LUCKWILL, L.C. The genus *Lycopersicon*; an historical, biological and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. Aberdeen: **Aberdeen University Studies**, 1943, 44p.
- JANZAC, B.; FABRE, M.F., PALLOIX, A.; MOURY, B. Characterization of a new potyvirus infecting pepper crops on Ecuador. **Archives of Virology**, New York, v.153, p.1543-1548, 2008a.
- JANZAC, B. FABRE, M-F, PALLOIX, A., MOURY, B. Mechanism and spectrum of action of the pvr4 resistance in pepper against potyviruses and selection of virulents variants. **Plant Pathology**. Oxford, 2008b.
- JANZAC, B. Risques de contournement et strategies de gestion durable des resistances aux potyvirus chez le pimant. 2008, 141p. **Tese de Doutorado** – Institut National de la Recherche Agronomique INRA. Paris, 2008.
- JENKINS, J.A. The origin of the cultivad tomato. **Economic Botany**, Bronx, v. 2, p. 379-392, 1948.
- JONES, L., HAMILTON, A.J., VOINNET, O., THOMAS, C.L., MAULE, A.J. & BAULCOMBE, D.C. RNA-DNA interactions and DNA methylation in posttranscriptional gene silencing. **Plant Cell**, Waterbury, v. 11, p. 2291-2301, 1999.

- JUHÁSZ, A.C.P.; SILVA, D.J.H.; ZERBINI JÚNIOR, F.M.; SOARES, B.O.; AGUILERA, G.A.H. Screening of *Lycopersicon* sp. Accessions for resistance to *Pepper yellow mosaic virus*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 510-512, 2006.
- JUHÁSZ, A.C.P.; SILVA, D.J.H.; ZERBINI, F.M.; CARNEIRO, P.C.S.; SOARES, B.O. & CRUZ, C.D. Base genética da resistência de um acesso de tomate silvestre ao mosaico-amarelo do pimentão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 713, 2008.
- JULIATTI, F.C. & MALUF, W.R. Controle genético da resistência do tomateiro a um isolado de tospovírus (TSWV): análise em plantas individuais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 39-47, 1995.
- JULIATTI, F.C.; MALUF, W.R.; GOULART, L.R. & RESENDE, R.O. Seleção de progênies resistentes a um isolado de tospovírus em *Lycopersicon esculentum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 167-172, 1996.
- KAWOKA, Y. **Biology of negative stranded RNA viruses: the power of reverse genetics**, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, p. 347, 2004.
- KELLY, J.D. & MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 4, p. 1-11, 1998.
- KIKUTA, K.; FRAZIER, W.A. Breeding tomatoes for resistance to spotted wilt in Hawaii. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.47, p. 242-276, 1946.
- KORMELINK, R. Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology**, New York, v. 200, n. 1, p. 56-65, 1994.
- KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 17, p. 143-182, 1999.
- KUROZAWA, C., and M. A. PAVAN, 2005 Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), pp. 607-626 in **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, edited by H. KIMATI, L. AMORIM, J. A. M. REZENDE, A. B. FILHO and L. E. A. CAMARGO, São Paulo. 2011.
- KYLE, B.C.; PALLOIX, A. Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. **Euphytica**, Wageningen, v.97, p.183-188, 1997.
- MACIEL-ZAMBOLIM, E., COSTA, H., CAPUCHO, A.S., DE ÁVILA, A.C., INOENAGATA, A.K. & KITAJIMA, E.W. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 325-327, 2004.

- MALUF, W.R.; BRAGHINI, M.T. & CORTE, R.D. Progress in breeding tomatoes for resistance to tomato spotted wilt. **Revista Brasileira de Genética**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 509-525, 1991.
- MARTIN, G.B.; BOGDANOVE, A.J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 23-61, 2003.
- MEDEIROS, R. B.; T. L. GERMAN. Identification of a plant virus putative receptor in the insect vector cells. **Virus Reviews & Research**, Belo Horizonte, v. 5, p. 191, 2000.
- MELO, P.C.T. de & CARNEIRO, L. Tomato breeding for tospovirus resistance for Brazilian subtropical and tropical conditions. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PROCESSING TOMATO and INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL TOMATO DISEASES**, 1., Recife, 1996. *Proceedings*. Alexandria, p.172-173. 1997.
- MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998a.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **BIOTECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.5, p.14-17, 1998b.
- MILLER, P. **The gardeners dictionary**, Abridged 4th ed. London. 1754.
- MILLIGAN, S.B.; BODEAU, J.; YAGHOUBI, 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. **Plant Cell**, Waterbury, v. 10, p. 1307-1319, 1998.
- MINAMI, K.; HAAG, H.P. O tomateiro. 2 ed. Campinas: **Fundação Cargill**, 397p. 1980.
- MIR, M. A. et al. Hantavirus N protein exhibits genus-specific recognition of the viral RNA panhandle. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 22, p. 11283-92, 2006.
- MOON, H. Identification of AFLP markers linked to tomato spotted wilt virus resistance in tobacco. Raleigh: North Carolina State University, 2006. 91p. **Dissertation** (PhD).
- MOURA, M. F.; MITUTI, T. A classification of Pepper yellow mosaic virus isolates into pathotypes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 4, p. 549-552, 2011.
- MULLER, C. H. A revision of the genus *Lycopersicon*. **U.S.D.A. Miscellaneous Publications**, Washington, v. 382, p. 1-28, 1940.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 55, p.335-350, 1987.
- MURPHY, F.A.; JARLFORS, U.; SHAW, J.G. Development of cylindrical inclusions in Poyvirus-infected protoplasts. **Phytopathology**, Saint Paul, v.81, p.371-374, 1991.

NAGAI, H. Resistance to spotted wilt virus hybrid tomatoes derived from *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. **Revista de Olericultura**, Campinas, v. 15, p. 22-23, 1975.

NAGAI, H. Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência ao vírus Y. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 3-9, 1983.

NAGAI, H.; LOURENÇÃO, A. L. & SIQUEIRA, W.J. Tomato breeding for resistance to diseases and pests in Brazil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, 301:91-97, 1992.

NAGAI, H.; SIQUEIRA, W.J.; LOURENÇÃO, A.L. & MELO, A.M.T. Resistência ao vírus de vira-cabeça do tomateiro nos derivados do cv. Stevens. **Horticultura brasileira**. Brasília, v. 11, n. 1, p. 85, 1993.

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

NAGATA, T., A. C. D. ÁVILA, P. C. M. TAVARES, C. J. BARBOSA, F. C. JULIATTI. Occurrence of different tospoviruses species in six states of Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 90-95, 1995.

NICAISE, V., GERMAN-RETANA, S., SANJUÁN, R., DUBRANA, M., MAZIER, M., MAISONNEUVE, B., CANDRESSE, T., CARANTA, C. & LEGALL, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 132, p. 1272-1282, 2003.

NICHOT, S. et al. Bunyaviridae. In: FAUQUET, C.;MAYO, M., *et al* (Ed.). **Virus Taxonomy: VIIIth Report of the ICTV**, San Diego, p.695-716, 2005.

NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT III, B.F. & DANGL, J.L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 579-609, 2003.

NOBREGA, N.R.; SILBERSSCHMIDT, K. Uma provável variante do vírus Y da batatinha (*Solanum vírus 2*, Orton) que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.15, p.307-333, 1944.

NOGUEIRA, D. W. Seleção assistida pelo marcador molecular tipo SCAR 'Sw-421' para seleção de genótipos de tomateiro resistentes ao vira-cabeça. 2005. 20p. **Trabalho de conclusão de curso** (Graduação em Agronomia) – UFLA, Lavras, MG.

NOGUEIRA, D. W.; MALUF, W. R.; PAIVA, L. V.; FIGUEIRA, A. R.; NASCIMENTO, I.R.; GONÇALVES, L.D.; MACIEL, G.M.; NIZIO, D.A.C.; SILVA, V.F.; GONÇALVES NETO, A.C. Marcador molecular associado ao alelo *Ty-1* em tomateiro e sua eficiência de seleção. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de plantas, 4., 2007, São Lourenço.UFLA, p. 452 **Anais...**São Lourenço, 2007.

- OLIVEIRA, A. C. B.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. **Documentos IAC**, Campinas: Instituto Agrônômico, v. 81, n., p. 17, 2007.
- 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, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. **Plant Cell**, Waterbury, v. 9, p. 521-532, 1997.
- PAAPE, M. et al. At-4/1, an interactor of the Tomato spotted wilt virus movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 874-83, 2006.
- PALIWAL, Y. C. Some properties and thrips transmission of tomato spotted wilt virus in Canada. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, p. 1177-1182, 1974.
- Pan, Q.; Wendel, J.; Fluhr, R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 50, p. 203-213, 2000.
- PANTHEE, D.R.; FOOLAD, M.R. A reexamination of molecular markers for use in marker-assisted breeding in tomato. **Euphytica**, Wageningen, v. 184, p. 165-179, 2012.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n., p. 985-993, 1993.
- PARRELLA, G.; RUFFEL, S.; MORETTI, A.; MOREL, C.; PALLOIX, A.; CARANTA. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in collinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, p. 855-861, 2002.
- PATERSON, R.G.; SCOTT, S.J.; GERGERICH, R.C. Resistance of two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of *Tomato spotted wilt virus*. **Euphytica**, Wageningen, v. 43, p. 173-178, 1989.
- PERALTA, I.E. & SPOONER, D.M. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, p. 1888-1902, 2001.
- PERALTA, I.E., KNAPP, S. & SPOONER, D.M. New species of wild tomatoes (*Solanum* Section: *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, Kent, v. 30, p. 424-434, 2005.
- PIRONE, T.P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.227-247, 1996.

- PRYOR, T. & ELLIS, J. The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. **Advances in Plant Pathology**, London, v. 10, p. 281-305, 1993.
- PROVVIDENTI, R.; HAMPTON, R. O. Sources of resistance to viroses in the potyviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 5, p. 189-211, 1992.
- POZZER, L.; RESENDE, R. O.; LIMA, M. F.; KITAJIMA, E.; GIORDANO, L. B.. Tospovirus: uma visão atualizada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 95-148, 1996.
- RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites, and machines. **Trends in Genetics**, London, v. 9, p. 275-280, 1993.
- REIS A; BOITEUX LS; COSTA H. *Determinação de espécies e de raças de isolados de Verticillium oriundos de diferentes Estados do Brasil*. Brasília: Embrapa Hortaliças. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 31. 13p., 2007.
- RESENDE, R. O., L. POZZER, T. NAGATA, I. C. BEZERRA, M. I. LIMA. New Tospoviruses Found in Brazil. Proceedings of the International Symposium on Tospovirus and Thrips of Floral and Vegetable Crops. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 431, n. 1, p. 78-89, 1996.
- RESENDE, L.V.; FERRAZ, E.; FRANÇA, J.G.E.; QUILOMBO, H.A. & SILVA, A.A.S. Identification and selection of processing tomato genotypes resistant to tospovirus. In: SCIENTIFIC SIMPOSIUM ON THE PROCESSING TOMATO, 6, Pamplona, 1998. **Abstracts**, p.105-106, 1998.
- RIBEIRO, D. et al. Tomato spotted wilt virus glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. **Journal of General Virology**, London, v. 89, n. 8, p. 1811-1818, 2008.
- RIBEIRO, D.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, R. Requirements for ER-arrest and sequential exit to the golgi of Tomato spotted wilt virus glycoproteins. **Traffic**, Washington, v. 10, n. 6, p. 664-672, 2009.
- RICHMOND, K. E. et al. Characterization of the nucleic acid binding properties of tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein. **Virology**, New York, v. 248, n. 1, p. 6-11, 1998.
- RICK, C.M. The potencial of exotic germplasm for tomato improvement. In: Vasil, I.K., Scowcrot, W.R., Frey, H.J. (eds.) **Plant improvement and somatic cell genetics**, New York, p. 478-495. 1982.
- RICK, C.M., HOLLE, M. Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. **Economic Botany**, New York, v. 44, p. 69-78, 1990.
- RICK, C.M, H. Laterrot, and J. Philouze. A revised key for the *Lycopersicon* species. **TGC Rep**, New York, v. 40, p. 31, 1990.

RICK, C.M. Tomato paste: A concentrated review of genetic highlights from the beginning to the advent of molecular genetics. **Genetics**, London, v. 128, p. 1-5, 1991.

ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.11, p.40-45, 2006.

ROOSSINCK, M.J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 191-209, 1994.

ROSELLÓ, S.; SOLER, S.; DIEZ, M. J.; RAMBLA, J. L.; RICHARTE, C.; NUEZ, F. New sources for high resistance of *Tomato spotted wilt virus* from *Lycopersicon peruvianum*. **Plant Breeding**, Westport, v. 118, p. 425-429, 1999.

RUFFEL, S.; DUSSAULT, M.; PALLOIX, A.; MOURY, B.; BENDAHMANE, A.; ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). **Plant Journal**, Oxford, v.32, p. 1067-1075, 2002.

RUFFEL, S., GALLOIS, J.L., LESAGE, M.L. & CARANTA, C. The potyvirus recessive resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2- eIF4E* gene. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 274, p. 346-353, 2005.

SAAVEDRA, G., SPOOR, W., HARRIER, L. Molecular markers and genetic base broadening in *Lycopersicon* spp. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 546, p. 503-507, 2001.

SAKIMURA, K. *Frankliniella fusca*, an additional vector of tomato spotted wilt virus, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 412-415, 1962.

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**, Cambridge, v. 86, p. 123-133, 1996.

SAMUEL, G., BALD, J.G., PITTMAN, H.A. Investigation on spotted wilt of tomatoes. **Australian Council of Science Industry Research Bulletin**, Sidney, v. 44, p. 64, 1930.

SANTANA, F. M. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly transmitted geminivirus from Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 122, p. 45-51, 2001.

SCOTT, J.W., STEVENS, M.R. & OLSON, S.M. An alternative source of resistance to *Tomato spotted wilt virus*. **Tomato Genetics Cooperative Report**, Gainesville, v. 55, p. 40-41, 2005.

SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J. & WARD, C.W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.13, p.178-191, 1991.

- SILVA, J.B.C., GIORDANO, L.B. Produção Mundial e Nacional. In: Silva, J.B.C., Giordano, L.B. (eds.) *Tomate para processamento industrial*. Brasília: **Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia/Embrapa Hortaliças**, 168p., 2000.
- SILVEIRA, L.M., QUEIRÓZ, M.A., LIMA, J.A.A., NEGREIROS, M.Z., RAMOS, N.F. & NASCIMENTO, A.K.Q. Seleção de acessos e progênies de *Citrullus* spp. para resistência a três potyvirus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 394-399, 2005.
- SNIPPE, M., BORST, W.L., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. Tomato spotted wilt virus Gc and N proteins interact in vivo. **Virology**, New York, v. 357, p. 115-123, 2007.
- SOELLICK, T. et al. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Boston, v. 97, n. 5, p. 2373-2378, 2000.
- SOLLER, M. & BECKMANN, J.S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 67, p. 25-33, 1983.
- SOMSSICH, I.E. & HAHLBROCK, K. Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, p. 86-90, 1998.
- SONG, W. Y.; PI, L. Y.; WANG, G. L.; GARDNER, J.; HOLSTEN, T.; RONALD, P. C. Evolution of the rice Xa21 disease resistance gene family. **American Society of Plant Physiologists**, Lancaster, v. 9, p. 1279-1287, 1997.
- 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**, Dordrecht, v. 7, p. 151- 161, 2001.
- STAMOVA, B.S.; CHETELAT, R.T. Inheritance and genetic mapping of *Cucumber mosaic virus* resistance introgressed from *Lycopersicon chilense* into tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin v. 101, p. 527-537, 2000.
- STEIN, N., PEROVIC, D., KUMLEHN, J., PELLIO, B., STRACKLE, S., STRENG, S., ORDON, F. & GRANER, A. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive *Bymovirus* resistance in *Hordeum vulgare*. **Plant Journal**, Oxford, v. 42, p. 912-922, 2005.
- STEVENS, M.A.; RICK, C.M. Genetics and breeding. In p. ATHERTON, J.G.; RUDICH, J. **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. Chapman & Hall, London, 1986. p. 34-109.
- STEVENS, M. R.; SCOTT, S. J.; GERGERICH, R. C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. **Euphytica**, Wageningen, v. 59, p. 9-17, 1992.

STEVENS, M.R., SCOTT, S.J. & GERGERICH, R.C. Evaluation of seven *Lycopersicon* species for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV). **Euphytica**, Wageningen, v. 80, p. 79-84, 1994.

STORMS, M. M. et al. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. **Virology**, New York, v. 214, n. 2, p. 485-93, 1995.

SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Introdução à genética**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 633 p. 1992.

TAKEDA, A., SUGIYAMA, K., NAGANO, H., MORI, M., KAIDO, M., MISE, K., TSUDA, S. & OKUNO, T. Identification of a novel RNA silencing suppressor, Nss protein of *Tomato spotted wilt virus*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 532, p. 72-79, 2002.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. & KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TENTCHEV, D.; VERDIN, E.; MARCHAL, C.; JACQUET, M.; AGUILAR, J. M.; MOURY, B. Evolution and structure of tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. **Journal of General Virology**, London, v. 92, p. 961-973, 2011.

THOMPSON, G.J. & ZIJL, J.J.B. van. Control of tomato spotted wilt virus in tomatoes in South Africa. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 431, p. 379-384, 1996.

URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A.-L., BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, v.74, p.157-175, 2001.

ULLMAN, D. E., J. J. CHO, R. F. L. MAU, D. M. WESTCOT and D. M. CUSTER. A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flowerthrips. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 1333-1342, 1992.

ULLMAN, D.E., WHITFIELD, A.E. & GERMAN, T. Thrips and tospoviruses come of age. Mapping determinants of insect transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Boston, v. 102, p. 4931-4932, 2005.

VIDAVSKY, F.; CZOSNEK, H. Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.88, p.910-914, 1998.

VON BARGEN, S. et al. Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 39, n. 12, p. 1083-1093, 2001.

WALPITA, P.; FLICK, R. Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: A global perspective. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, n. 1, p. 9-18, 2005.

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.5, p.185-189, 1989.

WITTMANN, S.; CHATEL, H. *et al.* Interaction of the viral protein genome linked [proteinase] of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. **Virology**, New York, v. 234, n. 1, p. 84-92, 1997.

WIJKAMP, I., J. V. LENT, R. KORMELINK and D. PETER. Multiplication of Tomato spotted wild virus in its insect vector *Frankliniella occidentalis*. **Journal of General Virology**, London, v. 74, p. 341-349, 1993.

WIJKAMP, I., and D. PETER. Determination of the median latent period of two tospoviruses in using a novel leaf disk assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 986-994, 1993.

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

YEAM, I.; CAVATORTA, J.R.; RIPOLL, D.R.; KANG, B.; JAHN, M.M. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. **Plant Cell**, Waterbury, v.19, p.2913-2928, 2007.

YOSHII, M., NISHIKIORI, M., TOMITA, K., YOSHIOKA, N., KOZUKA, R., NAITO, S. & ISHIKAWA, M. The *Arabidopsis Cucumovirus* multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 6102-6111, 2004.

ZHANG, Y. Y.; QI, M. F. *et al.* Molecular cloning and characterization of a gene encoding eukaryotic initiation factor iso4E in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 27, n. 3, p. 400-406, 2009.

ZIJL, J.J.B. van; BOSCH, S.E. & COETZEE, C.P.J. Breeding tomatoes for processing in South Africa. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 194, p. 69-75, 1986.