



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

Estudo da interação tospovírus – tomateiro: Análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de *Groundnut ringspot virus* (GRSV)

MARIA GEANE FONTES

BRASÍLIA – DF

2017

MARIA GEANE FONTES

Estudo da interação tospovírus – tomateiro: Análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de *Groundnut ringspot virus (GRSV)*

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

Orientador

Leonardo Silva Boiteux, Ph.D.

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2017

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus queridos pais, Maria dos Remédios e Valdemar, meus principais incentivadores, e também aos meus queridos irmãos e sobrinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por toda a força, coragem, iluminação e discernimento na busca pelos meus objetivos.

Ao CNPq e a Capes pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos meus pais, irmãos, sobrinho e minha avó por serem a minha base e modelo de família, obrigada pelo carinho e incentivo e por apoiarem as minhas escolhas.

Aos meus tios e primos pelo carinho e incentivo.

Agradeço ao meu orientador Leonardo Boiteux por todos os ensinamentos, paciência e incentivo.

Obrigada por acreditar e confiar em mim, e pelo entusiasmo inspirador no exercício da profissão.

À Dra. Esther que tanto contribuiu para realização deste trabalho, por toda a orientação, disponibilidade e paciência.

À Dra. Mirtes pela colaboração e por permitir o uso do Laboratório de Virologia.

Aos professores da UnB por todos os ensinamentos, especialmente ao querido Professor Cláudio que nos inspira a sempre buscar o conhecimento e a exercer com amor a profissão que escolhemos.

Agradeço também ao Professor Renato pela contribuição para a realização deste trabalho e por ter me inspirado a trabalhar com virologia.

Ao secretário do Departamento de Fitopatologia Ribamar pela paciência e disponibilidade.

Aos técnicos do Laboratório de Genômica e Melhoramento da Embrapa Hortaliças, Willian e especialmente ao Chico e Getúlio por toda a disponibilidade e paciência.

À equipe de campo da Embrapa Hortaliças Claudemir, Ronan, Maria, Wesley e Sebastião pela disponibilidade e ajuda para a realização desse trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Virologia Lúcio e Hamilton que também contribuíram para a realização desse estudo.

Aos amigos e ex-professores da graduação Beatriz Barguil e Evando Beserra por toda a amizade e por terem me incentivado a trilhar o caminho da pós-graduação.

Aos meus queridos amigos Cléia, Rafaela, Elenice, Karina, Débora, Daniela, Celma, Niday, João, Ricardo, Cristiano e Maurício pelos momentos de alegrias e pelo suporte nos momentos difíceis.

A amiga Carina por ter me acolhido em seu lar quando retornei do doutorado sanduíche, por todo o apoio e por ter sido tão importante para minha adaptação em Brasília.

Aos amigos que fiz em Davis que tornaram meus dias mais felizes Bruna, Lia, Pedro, Júlio Cesar, Joe, Juliana, Rebeca, Áurea, Oscar, Pablo, Carol e Tanya.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
GENERAL ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA	18
Origem, taxonomia e importância do tomateiro	18
Gênero <i>Tospovirus</i>	20
Importância econômica.....	20
Taxonomia e diversidade viral	22
Reclassificação da família <i>Bunyaviridae</i> (2017).....	25
Estrutura da partícula, genoma e estratégia de replicação viral.....	26
Ciclo infeccioso de tospovírus	28
Transmissão e vetores das espécies de <i>Tospovirus</i>	34
Sistemas de defesa na interação planta–patógeno	37
Genes R dominantes	41
Modelos de reconhecimento dos genes R.....	46
Resistência recessiva	49
RNA interferente (RNAi)	50
O locus <i>Sw-5</i> introgridido de <i>Solanum peruvianum</i>	51
Superação (“quebra”) da resistência mediada por <i>Sw-5</i>	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
JUSTIFICATIVA	71
OBJETIVOS	73
CAPÍTULO II: Transcritoma da interação compatível <i>Solanum lycopersicum</i> ‘Santa Clara’–<i>Groundnut ringspot virus</i> revela um amplo reportório de genes modulados pela infecção viral em uma hospedeira altamente suscetível	74
RESUMO	74
ABSTRACT	75
INTRODUÇÃO	76
MATERIAL E MÉTODOS	80
Obtenção e preparo do inóculo para os bioensaios.....	80
Material vegetal e inoculação com um isolado de GRSV.....	81
Coletas de amostras para análise do transcritoma da interação <i>S. lycopersicum</i> ‘Santa Clara’–GRSV	82
Extração do RNA total.....	83
Preparo das amostras de RNA.....	84
Purificação e fragmentação do mRNA.....	85
Síntese do cDNA.....	86
Reparo dos terminais 3’ e 5’ e adenilação da extremidade 3’.....	86
Ligação dos adaptadores e sequenciamento das bibliotecas.....	86
Análise de bioinformática dos dados de RNAseq e alinhamento dos <i>reads</i> ao genoma de referência.....	87
Análise quantitativa da expressão gênica.....	88
Anotação das sequências gênicas.....	88
RESULTADOS	88
Mapeamento dos <i>reads</i> ao genoma de referência.....	88

Análise quantitativa da expressão gênica.....	90
Anotação funcional e classificação dos genes diferencialmente expressos.....	92
Análise de genes regulados positivamente nos diferentes períodos avaliados.....	102
Modificações transcricionais em funções relacionadas à patogênese viral.....	114
Genes diferencialmente expressos envolvidos com vias de sinalização de respostas de defesa.....	124
DISCUSSÃO	129
CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
CAPÍTULO III: Espectro de eficiência e especificidade da resistência da cultivar ‘Rey de Los Tempranos’ (‘PI 203230’) e da linhagem ‘LAM 147’ (gene Sw-5) contra diferentes espécies/isolados de <i>Tospovirus</i>	161
RESUMO	161
ABSTRACT	163
INTRODUÇÃO	164
MATERIAL E MÉTODOS	167
Local de Realização dos ensaios	167
Isolados virais	167
Preparo do inóculo	168
Materiais genéticos de tomateiro avaliados para resposta a tospovírus	169
Preparo das mudas e inoculação de ‘Rey de Los Tempranos’, ‘Santa Clara’ e ‘LAM 147’	169
Obtenção, identificação e inoculação de plantas híbridas oriundas do cruzamento entre ‘Santa Clara’ x ‘Rey de Los Tempranos’	170
Avaliação das respostas dos acessos inoculados aos isolados de tospovírus.....	170
Caracterização da espécie viral.....	171
Amplificação do gene codificador da proteína N.....	171
Amplificação do gene codificador da proteína NSm.....	171
RESULTADOS	173
DISCUSSÃO	182
CONCLUSÕES	189
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	190
CAPÍTULO IV: Identificação de soja, ervilha, almeirão, jiló e jurubeba vermelha como novas hospedeiras naturais de <i>Groundnut ringspot virus</i> (GRSV) no Brasil	194
RESUMO	194
ABSTRACT	195
INTRODUÇÃO	197
MATERIAL E MÉTODOS	199
Coleta de amostras foliares sintomáticas.....	199
Avaliação em círculo de hospedeiras.....	199
Sorologia (dot blot).....	201
RT-PCR (<i>Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction</i>)	202
RESULTADOS	203
DISCUSSÃO	206
CONCLUSÕES	210
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	211

FICHA CATALOGRÁFICA

Fontes, Maria Geane

Estudo da interação tospovírus – tomateiro: análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de *Groundnut ringspot virus* (GRSV)./

Maria Geane Fontes

Brasília, 2017.

Número de páginas 214p.

Tese de Doutorado. Programa de Pós – Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília – DF.

1. Expressão gênica, RNAseq, patogênese, resistência, tospovírus, GRSV.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Estudo da interação tospovírus – tomateiro: análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB), sob orientação do **Dr. Leonardo Silva Boiteux**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Estudo da interação tospovírus – tomateiro: análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de *Groundnut ringspot virus* (GRSV)

Maria Geane Fontes

TESE APROVADA em 31/03/2017 por:



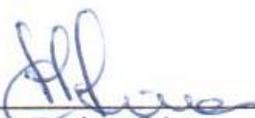
Dr. Danilo Batista Pinho
Universidade de Brasília - Examinador Interno



Dr. Robert Neil Gerard Miller
Universidade de Brasília - Examinador Interno



Dra. Angela Mehta dos Reis
Embrapa Cenargen - Examinadora Externa



Dra. Mirtes Freitas Lima
Embrapa Hortaliças - Examinadora Externa



Dr. Leonardo Silva Boiteux
Embrapa Hortaliças - Orientador (Presidente)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2017**

RESUMO GERAL

Fontes, Maria Geane. **Estudo da interação tospovírus – tomateiro: Análise transcritômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de *Groundnut ringspot virus* (GRSV).** 2017. 214 p. Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes no Brasil e no mundo. A doença comumente conhecida como ‘vira cabeça’ (causada por espécies de *Tospovirus*) é uma das mais importantes afetando o tomateiro a nível mundial. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo estudar a interação tomateiro-tospovírus através da análise transcritômica na interação compatível *Solanum lycopersicum*–*Groundnut ringspot virus* (GRSV), da avaliação da resistência a tospovírus na cv. ‘Rey de Los tempranos’ (=‘PI 203230’) e da caracterização de novas espécies hospedeiras de GRSV. No **CAPÍTULO II** foi realizado um estudo do transcritoma na interação compatível entre a cultivar de tomate ‘Santa Clara’ e GRSV com a finalidade de identificar genes inibidos ou induzidos após inoculação do vírus. Amostras foliares de plantas da cv. ‘Santa Clara’ (mecanicamente inoculadas com um isolado de GRSV e *mock*-inoculadas) foram coletadas a 0, 3, 5, 7 e 10 dias após a inoculação. Um ‘*pool*’ equimolar entre os períodos 3-5 (3-5DAI) e 7-10 (7-10DAI) foi estabelecido após a extração do RNA, análise da concentração e da qualidade. Um total de 12 bibliotecas de cDNA foram sequenciadas gerando um total de 396 milhões *reads* que foram mapeados no genoma de referência do tomateiro. Cerca de 9.206 genes foram diferencialmente expressos na interação *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’ – GRSV. Dentre esses genes 5.562, 5.283 e 3.924 foram identificados como diferencialmente expressos nos períodos 0DAI, 3-5DAI e 7-10DAI, respectivamente. O espectro

de eficiência da resistência identificada na cultivar de tomate ‘Rey de Los Tempranos’ foi investigada em bioensaios envolvendo a inoculação mecânica com uma coleção de isolados de *Tospovirus* (**CAPÍTULO III**). Plantas da linhagem resistente ‘LAM 147’ (portadora do gene *Sw-5*) também foram avaliadas e a cv. ‘Santa Clara’ (isolinha suscetível de ‘LAM 147’) foi utilizada como controle suscetível. Os resultados indicaram que a resistência do acesso ‘Rey de Los Tempranos’ se caracteriza como sendo do tipo espécie-específica (funciona somente contra isolados de TSWV) e isolado-específica (alguns isolados de TSWV são capazes de ‘quebrar’ a resistência). Plantas híbridas (F₁) resultante de cruzamentos realizados entre ‘Rey de Los Tempranos’ e cv. ‘Santa Clara’ (inoculadas com o isolado TSWV #523) não exibiram sintomas, indicando que esta seria uma resistência conferida por fator(es) dominante(s). No **CAPÍTULO IV**, amostras foliares com sintomas similares aos induzidos por espécies de *Tospovirus* (clorose, necrose foliar intensa, mosqueado, anéis concêntricos e deformação foliar) foram coletadas em campos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], ervilha (*Pisum sativum* L.), jiló (*Solanum aethiopicum* L. var. *gilo* Raddi), almeirão (*Cichorium intybus* L.) e jurubeba vermelha (*S. stramonifolium* Jacq.) em Brasília–DF, Brasil. Para a identificação do agente causal dessas doenças foram realizados testes sorológicos, moleculares e bioensaios examinando o círculo de plantas hospedeiras. Resultados dos testes moleculares e sorológicos (ELISA) mostraram que as plantas sintomáticas foram positivas apenas para a espécie GRSV. Todos os isolados foram capazes de induzir sintomas característicos de tospovirose nos ensaios de círculos de hospedeiras. Desta forma, o presente trabalho também relata pela primeira vez cinco novas espécies como hospedeiras naturais de GRSV em condições brasileiras.

Palavras chaves: Expressão gênica, RNAseq, patogênese, resistência, tospovírus, GRSV.

GENERAL ABSTRACT

Fontes, Maria Geane. **Study on tospovirus – tomato interaction: Transcriptomic analysis, resistance spectrum of the accession ‘PI 203230’ and identification of new hosts of *Groundnut ringspot virus* (GRSV).** 2017. 214p. Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important vegetables in Brazil and around the world. The disease universally known as ‘spotted wilt’ is caused by species of *Tospovirus* and it is one of the most important problems affecting tomato crops worldwide. The main objectives of the present work were to study the tomato–tospovirus interaction via transcriptional analysis of a compatible interaction *Solanum lycopersicum*–*Groundnut ringspot virus* (GRSV), to evaluate the spectrum of resistance to tospovirus in the cultivar ‘Rey de Los Tempranos’ (=‘PI 203230’) and to characterize new GRSV hosts. A transcriptome study on the compatible interaction between the tomato cultivar ‘Santa Clara’ and GRSV (**CHAPTER II**) was conducted in order to identify genes inhibited and/or induced after virus infection in ‘Santa Clara’ (a highly susceptible tomato accession). Leaf samples of ‘Santa Clara’ plants mechanically inoculated with one GRSV isolate as well as *mock*-inoculated plants were collected at 0, 3, 5, 7 and 10 days after inoculation (DAI). Equimolar pools of the periods 3-5 (3-5DAI) and 7-10 (7-10DAI) were established after RNA extraction and concentration and quality assesment. Twelve cDNA libraries were sequenced and a total of 396.2 millions reads were mapped into the tomato reference genome. About 9,206 genes were differentially expressed in the interaction *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’–GRSV. Among these genes, 5,283; 5,562 and 3,924 genes were identified as differential expressed in the periods 0DAI, 3-7-5DAI, and 10DAI, respectively. The resistance spectrum of the cultivar ‘Rey de Los Tempranos’ was investigated in bioassays

involving mechanical inoculation with 22 tospovirus isolates (**CHAPTER III**). Plants of the resistant inbred line ‘LAM 147’ (carrying the *Sw-5* gene in homozygous condition) were also evaluated and the susceptible cultivar ‘Santa Clara’ (the near isogenic line of ‘LAM 147’) was used as susceptible control. The results indicated that the resistance of ‘Rey de Los Tempranos’ might be characterized as being species-specific (i.e. effective only against TSWV isolates) and isolated-specific (i.e. a subgroup of TSWV isolates was able to overcome the resistance). Hybrid plants (F₁) derived from the crosses between ‘Rey de Los Tempranos’ and ‘Santa Clara’ (inoculated with the TSWV #523 isolate) did not exhibit symptoms, indicating that the resistance could be conferred by dominant factor(s). In **CHAPTER IV**, foliar samples displaying symptoms similar to those induced by *Tospovirus* species (chlorosis, necrosis, leaf mottling, concentric rings and leaf deformation) were collected in production fields of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], field pea (*Pisum sativum* L.), chicory (*Cichorium intybus* L.), scarlet eggplant (*Solanum aethiopicum* L. var. *gilo* Raddi), and red jurubeba (*S. stramonifolium* Jacq.) in Brasília-DF, Brazil. Serological tests, molecular assays, and host range studies were carried out in order to identify the causal agents of these diseases. Serological tests (ELISA) showed that symptomatic plants were positive only for GRSV. PCR analyses of the soybean, field pea, scarlet eggplant, chicory, and red jurubeba were conducted using primers specific for the nucleocapsid protein (N). The sequence analyses of the tospovirus-derived amplicons displayed high identity with GRSV isolates. All isolates were able to induce characteristic symptoms of tospoviroses in all plant species employed in the host range studies. Thus, the present work also reports for the first time five new plant species as natural hosts of GRSV under Brazilian conditions.

Keywords: Gene expression, RNAseq, pathogenesis, resistance, tospovirus, GRSV.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça originária da região andina da América do Sul, abrangendo parte do Chile, Colômbia, Equador (incluindo as Ilhas Galápagos), Bolívia e Peru. O Brasil é um dos principais países produtores, e dentre as hortaliças cultivadas no país, o tomateiro é uma das culturas mais importantes, não apenas em termos de volume de produção, mas também em valor socioeconômico (Filgueira, 2003; Boiteux *et al.*, 2012). Em 2016, a produção brasileira de tomate foi de 3,7 milhões de toneladas, com aproximadamente 59 mil ha plantados e produtividade de 63,8 ton/ha. (IBGE, 2017).

Muitas doenças relatadas na cultura do tomateiro causam perdas na produtividade e qualidade dos frutos. A maioria das doenças é de origem bacteriana, virótica, fúngica, ou causada por nematoides. Dentre os principais grupos de vírus que causam doenças nessa cultura estão os begomovírus, os crinivírus, os cucumovírus, os potyvírus, os tobamovírus e, em destaque, os tospovírus que causam a doença comumente conhecida como ‘vira cabeça’ do tomateiro (Pereira-Carvalho *et al.*, 2014). De fato, os tospovírus estão entre os patógenos de maior importância para a agricultura mundial, provocando perdas em várias culturas, sobretudo em hortaliças (Goldbach & Peters, 1994; Scholthof *et al.*, 2011). No Brasil, as culturas mais afetadas são o tomateiro, a alface (*Lactuca sativa*), o pimentão (*Capsicum annuum*) e as pimentas (*C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum*).

A família *Bunyaviridae* abrange vírus com genoma de RNA tripartido, envelopados e que infectam plantas, pequenos mamíferos, primatas e pássaros. O TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) é a espécie tipo do gênero *Tospovirus*, que é o único gênero conhecido dentro da família *Bunyaviridae* capaz de infectar plantas (Fauquet *et al.*, 2005). O genoma dos tospovirus apresenta uma combinação de polaridades negativa e ambisenso e consiste de três segmentos de

RNA denominados, de acordo com o seu tamanho, de L = *large* (~8.9 kb), M = *medium* (~4.8 kb) e S = *small* (~2.9 kb). O RNA L é de polaridade negativa e codifica a proteína estrutural RdRp (RNA polimerase dependente de RNA). O RNA M é ambisenso e codifica a proteína não estrutural NSm (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) na orientação senso positivo e os precursores das glicoproteínas Gn e Gc no sentido negativo. O RNA S também é ambisenso e sintetiza a proteína NSs (supressora do silenciamento gênico) na orientação senso positivo e na orientação senso negativo sintetiza a proteína N (que forma o nucleocapsídeo viral e que está envolvida na regulação da transcrição/replicação) (De Avila et al., 1992, Takeda et al., 2002, Bucher et al., 2003, Snippe et al., 2007).

As espécies de *Tospovirus* relatadas infectando hortaliças no Brasil incluem *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) e a espécie tentativa Bean necrotic mosaic virus (BeNMV) (Costa & Forster, 1941; Duarte et al., 1995; Nagata et al., 1998; Pozzer et al., 1999; de Oliveira et al., 2012). Existem diversos relatos de TSWV infectando solanáceas (Kitajima, 1986) e leguminosas (família Fabaceae) tais como ervilha – *Pisum sativum* L. (Reifschneider et al., 1989), como lentilha – *Lens culinaris* Medik (Fonseca et al., 1995); grão-de-bico – *Cicer arietinum* L. (Boiteux et al., 1995). No entanto, mais recentemente, diferentes levantamentos têm apontado que a ocorrência da espécie GRSV vem predominando em relação ao TSWV em áreas de cultivos com tomateiro, outras hortaliças e também em plantas nativas e invasoras (Lima et al., 2015). No Brasil, além do tomateiro, o GRSV tem sido formalmente reportado infectando o pimentão, pimentas, alface, cubio (*Solanum sessiliflorum*), pepino (*Cucumis sativus*), melancia (*Citrullus lanatus*) e amendoim (*Arachis hypogaea*) (de Ávila et al., 1990; Pappu et al. 2009; Boari et al., 2002; Spadotti et al., 2014; García et al. 2014; Leão et al., 2015; Lima et al.,

2015). A predominância de GRSV pode estar relacionada com a maior eficiência de transmissão pelo inseto vetor. A espécie de tripes *Frankliniella schultzei* foi identificada como o principal e mais eficiente inseto transmissor de GRSV em condições experimentais e naturais, explicando, desta forma, a prevalência desta espécie viral nos plantios de tomateiro do Brasil (**Nagata et al., 2004**).

As táticas ou estratégias disponíveis para controle das tospoviroses incluem o emprego de controle químico dos insetos vetores (tripes), proteção física das sementeiras e/ou das plantações (ex. plasticultura e cultivo protegido) e práticas culturais que minimizam a transmissão pelo vetor (**Pereira-Carvalho et al., 2014**). No entanto, a resistência genética aos vírus e/ou seus vetores é a abordagem mais prática para proteger as culturas de infecções virais. Neste contexto, variedades resistentes, quando disponíveis, são consideradas a forma mais eficiente, menos onerosa e mais confiável para o controle de doenças de etiologia viral (**Pereira-Carvalho et al., 2014**).

Até o momento, apenas dois genes dominantes de resistência contra tospovírus têm sido amplamente caracterizados e utilizados comercialmente em diferentes hospedeiras. Um deles é o gene oriundo da espécie de tomateiro selvagem *S. peruvianum* L., denominado *Sw-5* (**Stevens et al., 1991; Boiteux & Giordano, 1993**) e o gene dominante oriundo da espécie de pimenta *Capsicum chinense* Jacq. (**Cheng et al., 1989; Black et al. 1991; Boiteux et al., 1993**), que foi posteriormente identificado pela sigla *T_{sw}* (**Boiteux & De Ávila, 1994**).

O *locus Sw-5* foi mapeado na região telomérica do cromossomo nove do tomateiro e foi isolado via clonagem posicional (**Brommonschenkel et al., 2000**). Análises estruturais revelaram que o alelo resistente codifica uma proteína da classe CC-NB-LRR (**Brommonschenkel et al., 2000**). Estudos adicionais mostraram que esse gene reside dentro de um complexo (*cluster*) formado por cinco cópias análogas supostamente oriundas de um mesmo gene ancestral, denominadas de *Sw-5a* até *Sw-5e* (**Spassova et al., 2001**). Ensaios com plantas de fumo

transgênicas transformadas com as cópias *Sw-5a* e *Sw-5b* (separadas ou combinadas) demonstraram que o *Sw-5b* é a cópia funcional e suficiente para conferir resistência contra uma ampla gama de tospovírus, incluindo as principais espécies que comumente infectam o tomateiro (TSWV, GRSV, TCSV, CSNV) e também se mostrou eficiente contra outra espécie de tospovírus mais distantemente relacionada, o *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (Spasova *et al.*, 2001; Dianese *et al.*, 2011; Hallwass *et al.*, 2014).

A introdução e o amplo emprego do gene *Sw-5* em variedades comerciais de tomateiro e do gene *Tsw* em híbridos de pimentão levou a uma considerável redução nas perdas econômicas causadas por tospovírus. No entanto, o uso de materiais resistentes também serviu como uma pressão de seleção a favor de isolados virais capazes de superar esta resistência. De fato, já existem diversos relatos de isolados capazes de superar a resistência mediada pelos genes *Sw-5* e *Tsw* (Boiteux & Nagata, 1993; Cho *et al.*, 1995; Latham & Jones, 1998; McMichael *et al.*, 2002; Aramburu & Marti, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2016). Desta maneira, a contínua identificação e caracterização de novas fontes de resistência a tospovírus em germoplasma de tomate e a determinação das bases genéticas de tal resistência é de grande importância para o manejo dessas viroses. Estes trabalhos possibilitam a diversificação e a ‘piramidização’ de diferentes genes/alelos em híbridos comerciais, objetivando obter uma resistência ampla e com maior estabilidade e durabilidade.

A elucidação dos mecanismos envolvidos nas interações gene R–vírus pode permitir a inferência sobre quais as etapas do ciclo infeccioso do patógeno são afetadas pela ação dos produtos codificados pelos genes de resistência. Além disso, o entendimento das interações compatíveis patógeno–hospedeiro podem fornecer informações cruciais sobre os mecanismos de patogênese e quais os genes da planta hospedeira podem ser inibidos ou induzidos pela infecção.

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

Origem, taxonomia e importância do tomateiro – O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça originária da região andina da América do Sul, abrangendo norte do Chile, Colômbia, Bolívia, Peru até o sul do Equador e Ilhas Galápagos. Embora as espécies selvagens de tomateiro sejam originárias dessas áreas, sua domesticação ocorreu no México, sendo, portanto, o centro de origem secundário da cultura (Harvey *et al.*, 2002). O tomateiro foi cultivado na Europa, inicialmente, apenas por curiosidade, devido ao valor ornamental de seus frutos. Os tomates foram considerados, naquela época, como venenosos, fato que postergou o uso dessa hortaliça na culinária (Filgueira, 2003). Os relatos históricos indicam que os italianos (por volta de 1550) foram os primeiros a cultivarem e utilizarem o tomate para consumo fresco. No entanto, o cultivo e consumo do tomate somente começaram a ter relevância mundial apenas a partir do século XIX. Atualmente, o tomateiro é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, sendo a quantidade produzida superada apenas pela batata. De acordo com Harvey *et al.* (2002), a produção e o consumo de tomate estenderam-se para os Estados Unidos no século XIX. No Brasil, o hábito de consumo foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX e intensificada com os imigrantes japoneses no início do século XX (Boiteux *et al.*, 2012).

O tomateiro e espécies silvestres taxonomicamente relacionadas são plantas dicotiledôneas, da ordem Tubiflorae, do gênero *Solanum* pertencente à família Solanaceae. Esta é uma família botânica extremamente diversificada que engloba cerca de 90 gêneros e 1750 espécies (Boiteux *et al.*, 2012). A taxonomia do tomateiro foi por muito tempo objeto de divergência entre botânicos, sendo inicialmente classificado como pertencente ao gênero *Lycopersicon* (Peralta *et al.*, 2006). Contudo, com base em evidências de estudos filogenéticos utilizando sequências de DNA e estudos morfológicos mais aprofundados foi verificada que as

espécies do gênero *Lycopersicon* e espécies do gênero *Solanum* são estreitamente relacionadas, sendo o tomateiro, então, reclassificado como *Solanum lycopersicum* L. (Spooner *et al.*, 2005). Esta nova classificação do tomateiro, conforme consta no *Code of Nomenclature for Cultivated Plants* (Brickell *et al.*, 2009), está sendo amplamente aceita por parte de taxonomistas, fisiologistas, melhoristas e geneticistas.

O tomate é uma hortaliça que faz parte da dieta alimentar da maioria da população brasileira. Dentre as hortaliças, é uma das culturas mais importantes, não apenas em produção, mas também em valor sócio econômico, estando o Brasil entre os principais países produtores (Boiteux *et al.*, 2012). O tomate pode ser consumido nas formas *in natura* e industrializado. Os frutos apresentam elevado valor nutritivo e contribuem para uma dieta mais saudável e equilibrada, pois contêm grandes quantidades de fibras, vitaminas do complexo B, ácido ascórbico (vitamina C), ferro e fósforo, além de ser rico em licopeno, substância do grupo dos carotenoides que está associada à prevenção de alguns tipos de câncer (Carvalho *et al.*, 2005). Em 2016, a produção brasileira de tomate foi de 3,7 milhões de toneladas, com aproximadamente 59 mil hectares plantados e produtividade de 63,8 ton/ha. A região Sudeste destaca-se como a maior produtora (48,1% da produção nacional), sendo São Paulo e Minas Gerais os principais Estados produtores. O segundo maior polo produtor é o Centro-Oeste, que contribuiu com 27,1 % da produção nacional em 2016. O Estado de Goiás é o maior produtor de tomate do país considerando a somatória dos dois principais setores produtivos (tomate para consumo *in natura* e tomate para processamento). Em 2016 a produção de Goiás foi estimada em 978. 258 toneladas (\approx 23,1 % da produção nacional), com quase 12 mil ha plantados e rendimento médio de 81 ton/ha. As regiões Sul e Nordeste contribuíram com 14,3% e 10,1 % da produção nacional de tomate, respectivamente (IBGE, 2017).

Mais de 100 doenças já foram relatadas afetando o tomateiro. Algumas delas são severas, podendo provocar significativa redução na produtividade ou na qualidade dos produtos comerciais. Essas doenças podem ser parasitárias (origem biótica) ou não parasitárias (origem abiótica). As principais doenças parasitárias são de origem bacteriana, fúngica, virótica ou causada por nematoides. As doenças não parasitárias, também conhecidas como distúrbios fisiológicos, são provocadas pela exposição da planta a condições ambientais desfavoráveis ao seu desenvolvimento, tais como: deficiência ou excesso de nutrientes, falta de oxigênio, falta ou excesso de água no solo, fitotoxidez de agrotóxicos e deficiência de luminosidade (**Reis & Lopes, 2012**). As principais doenças de origem viral do tomateiro são causadas por begomovírus, crinivírus, cucumovírus, potyvírus, tobamovírus e, com especial destaque, a doença comumente conhecida como “vira-cabeça do tomateiro” que é causada por tospovírus (**Pereira-Carvalho et al., 2014**).

Gênero *Tospovirus*

Importância econômica – Os tospovírus estão entre os agentes virais de maior importância para a agricultura mundial, provocando perdas em várias culturas, sobretudo em hortaliças (**Goldbach & Peters, 1994; Scholthof et al., 2011**). No Brasil as culturas mais afetadas pelas tospoviroses são o tomateiro, o pimentão (*Capsicum annuum*), as pimentas (*C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum*) e a alface (*Lactuca sativa*). A gama de hospedeiros de tospovírus varia de acordo com a espécie viral. O TSWV é a espécie que apresenta maior gama de hospedeiros entre os vírus de plantas, infectando mais de 900 espécies, tanto dicotiledôneas como monocotiledôneas em mais de 90 famílias botânicas (**Pappu et al., 2009**). As solanáceas e as asteráceas contêm o maior número de espécies suscetíveis ao TSWV, sendo as principais o tomate, o pimentão, o fumo (*Nicotiana tabacum*), a alface, o crisântemo (*Chrysanthemum* spp.) e também o amendoim

(*Arachis hypogaea*, família Fabaceae), dentre outras (Adkins *et al.*, 2005). As espécies virais que foram relatadas infectando naturalmente o tomateiro no Brasil são: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (Costa & Forster, 1941; Duarte *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2015).

Os sintomas ocasionados por espécies de tospovírus são diversos, sendo que os mais característicos incluem paralisação do crescimento, arroxamento e bronzeamento, inicialmente nas folhas apicais e manchas cloróticas e/ou necróticas em formato de anéis concêntricos nas folhas, deformação foliar, clorose, mosqueado e necrose foliar intensa (Pereira-Carvalho *et al.*, 2014). Frutos imaturos frequentemente desenvolvem anéis cloróticos e/ou necróticos irregulares. Nos frutos maduros, os anéis concêntricos se tornam ainda mais evidentes. Infecções precoces em variedades suscetíveis podem levar ao declínio completo e morte da planta. Durante os períodos mais quentes e secos do ano, perdas significativas são observadas devido a maior dispersão e multiplicação dos vetores (Pereira-Carvalho *et al.*, 2014).



Figura 1 – Sintomas típicos da infecção por tospovírus em tomateiro. Sintomas de necrose, clorose, manchas em formato de anéis concêntricos nas folhas e fruto, deformação foliar e nanismo.

Taxonomia e diversidade viral – A doença denominada “spotted wilt” ou “vira-cabeça” foi inicialmente observada na Austrália em 1915. Entretanto, na época, não foi possível elucidar a natureza do agente causal. Somente a partir dos trabalhos de **Samuel et al. (1930)** foi identificado o agente causal da doença como sendo um vírus, denominado de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). O TSWV tem sido reportado infectando diferentes culturas no Brasil desde 1940 (**Costa & Forster, 1941**). O TSWV é a espécie tipo do gênero *Tospovirus*, o qual é o único gênero conhecido dentro da família *Bunyaviridae* capaz de infectar plantas. Os demais gêneros que compõem essa família (*Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*) infectam vertebrados (**Fauquet et al., 2005**). O TSWV foi considerado, durante muito tempo, o único membro do gênero *Tospovirus*. A natureza monotípica do TSWV foi modificada apenas após a identificação e caracterização de novos vírus a partir do início da década de 1990, incluindo *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (**Law & Moyer, 1990; de Haan et al., 1992**) e posteriormente, *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (**Duarte et al., 1995; Nagata et al., 1998**).

A família *Bunyaviridae* abrange vírus com genoma de RNA tripartido, envelopados e que infectam plantas, pequenos mamíferos, primatas e pássaros. A alocação de espécies dentro do atual gênero *Tospovirus* baseia-se principalmente na morfologia do *virion*, na organização do genoma e nas características de transmissão via tripes (insetos da Ordem: Thysanoptera; família: Thripidae). Por sua vez, as características biológicas (como círculo de plantas hospedeiras e espécies do vetor) e características moleculares (sequência de aminoácidos da proteína N) têm sido utilizadas como os principais critérios taxonômicos para definir espécies dentro do gênero *Tospovirus* (**de Ávila, 1993; Resende, 1996; Roselló et al., 1996; Plyusnin et al., 2012**). De acordo com os atuais critérios taxonômicos, espécies distintas de *Tospovirus* devem apresentar

níveis de identidade inferior a 90% na sequência de aminoácidos da proteína N ([Plyusnin et al., 2012](#)).

Até o momento foram identificadas 29 espécies de tospovírus, entretanto, apenas dez são oficialmente reconhecidas como espécies pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*). As demais ainda se configuram como espécies tentativas (ou seja, ainda em análise) pelo ICTV ([Tabela 1](#)). As espécies TSWV, TCSV, GRSV e CSNV já foram descritas infectando tomateiro no Brasil ([Resende et al., 1996](#); [Dianese et al., 2010](#)). Entretanto, o GRSV tem sido identificado em diferentes levantamentos como sendo a espécie predominante em áreas de cultivos com tomateiro e de outras hortaliças nos últimos anos ([Lima et al., 2015](#)). TSWV, TCSV, GRSV e CSNV compõem um agrupamento de espécies que têm como provável centro de origem as regiões neotropicais ([Fauquet et al., 2005](#)). A espécie TSWV é cosmopolita ([Prins & Goldbach, 1998](#); [Whitfield et al., 2005](#)). A espécie GRSV tem sido reportada em várias hospedeiras no Brasil ([Lima et al., 2015](#)) e também infectando soja na África do Sul ([Pietersen & Morris, 2002](#)) e amendoim na Argentina ([de Breuil et al., 2007](#)), enquanto TCSV e CSNV são espécies que ainda estão circunscritas ao Novo Mundo ([Bezerra et al., 1999](#); [Webster et al., 2011](#)). Além das espécies que infectam o tomateiro, *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) e Bean necrotic mosaic virus (BeNMV) foram relatados no Brasil infectando abobrinha, cebola e feijão, respectivamente ([Nagata et al., 1998](#); [Pozzer et al., 1999](#); [de Oliveira et al., 2012](#)).

Tabela 1 – Lista das espécies de *Tospovirus* descritas (ICTV, 2016).

Acrônimo	Espécie viral	País da primeira detecção
ANSV	Alstroemeria necrotic streak virus	Colômbia
BeNMV	Bean necrotic mosaic virus	Brasil
CaCV	Capsicum chlorosis vírus	Austrália
CCSV	Calla lily chlorotic spot virus	Taiwan
CSNV	Chrysanthemum stem necrosis vírus	Brasil
GBNV	<i>Groundnut bud necrosis virus*</i>	Índia
GRSV	<i>Groundnut ringspot virus</i>	Brasil
GYSV	<i>Groundnut yellow spot virus</i>	Índia
HCRV	Hippeastrum chlorotic ringspot virus	China
INSV	<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	Estados Unidos
IYSV	<i>Iris yellow spot virus</i>	Holanda
LNRV	Lisianthus necrotic ringspot virus	Japão
MSMV	Melon severe mosaic vírus	México
MVBaV	Mulberry vein banding associated virus	China
MYSV	Melon yellow spot virus	Japão
PCFSV	Peanut chlorotic fan-spot virus	Taiwan
PCSV	Pepper chlorotic spot virus	Taiwan
PNSV	Pepper necrotic spot virus	Peru
PolRSV	<i>Polygonum ringspot virus</i>	Itália
SVNaV	Soybean vein necrosis-associated virus	Estados Unidos
TCSV	<i>Tomato chlorotic spot virus</i>	Brasil
TNRV	Tomato necrotic ringspot virus	Tailândia
TNSV	Tomato necrotic spot virus	China
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Austrália
TYRV	Tomato yellow ring virus	Irã
TZSV	Tomato zonate spot virus	China
WBNV	Watermelon bud necrosis virus	Índia
WSMoV	<i>Watermelon silver mottle virus</i>	Taiwan
ZLCV	<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i>	Brasil

* As espécies já estabelecidas pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) estão em itálico.

Reclassificação da família *Bunyaviridae* (2017) – Recentemente, em março de 2017, uma nova classificação taxonômica proposta pelo grupo de estudos de bunyavírus foi aceita e estabelecida pelo ICTV ([Adams et al., 2017](#)). Antes da submissão da proposta de reclassificação, a família *Bunyaviridae* era constituída de cinco gêneros (*Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*) de acordo com as características do genoma (RNA tripartido senso positivo e/ou negativo) ([Plyusnin et al., 2012](#)). No entanto, aproximadamente metade dos bunyavírus conhecidos (≈530 membros presumidos da família) não eram ou não poderiam ser atribuídos a nenhum destes cinco gêneros com base nos critérios de classificação estabelecidos. Entretanto, estudos demonstravam que muitos vírus descobertos, claramente agrupavam-se com os bunyavírus em análises filogenéticas de todas as suas proteínas, mas não eram classificados em nenhum dos gêneros descritos ([Tokarz et al., 2014](#); [Li et al., 2015](#)). Além disso, numerosos vírus de plantas com mais de três segmentos genômicos, atualmente membros dos gêneros *Emaravirus* e *Tenuivirus* já haviam sido referidos como "*bunyavirus-like*" com base no agrupamento de suas proteínas com proteínas dos bunyavírus ([Van Poelwijk et al., 1997](#); [Elbeaino et al., 2009](#)). Com base nessa problemática com relação à classificação da família *Bunyaviridae*, foi proposta uma reorganização taxonômica visando posicionar os diferentes bunyavírus que não poderiam ser atribuídos aos cinco gêneros existentes até o presente momento ([Junglen, 2016](#)). Neste contexto, foi proposta a elevação da família *Bunyaviridae* atualmente existente para uma ordem (Bunyavirales) para melhor refletir as relações evolutivas dos vários bunyavirus em um quadro taxonômico mais abrangente. O estabelecimento em nível de ordem foi substanciado por análises filogenéticas utilizando sequências concatenadas dos segmentos S, M e L típicos de bunyavírus. De acordo com a classificação atual a ordem Bunyavirales é composta por nove famílias (*Tospoviridae*, *Feraviridae*, *Fimoviridae*, *Hantaviridae*, *Jonviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae*) ([ICTV, 2017](#)). Com relação ao

gênero *Tospovirus* este foi reclassificado como *Orthotospovirus*, sendo o único gênero dentro da família *Tospoviridae*.

Estrutura da partícula, genoma e estratégia de replicação viral – As espécies que compõem o gênero *Tospovirus* possuem partículas virais esféricas envolvidas por uma membrana lipídica (derivada do hospedeiro) com diâmetro de 80-120 nm, denominada envelope. Associadas ao envelope estão duas glicoproteínas (Gn e Gc), responsáveis pela interação vírus-vetor, determinando a eficiência e a especificidade de transmissão viral (Ullman *et al.*, 2005, Wijkamp *et al.*, 1995) (Figura 2). A parte interna da partícula é composta pelo genoma viral encapsidado pela proteína N e cerca de 10-20 cópias da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Van Poelwuk *et al.*, 1993). O genoma dos tospovirus apresenta uma combinação de polaridade negativa e ambisenso e consiste de três segmentos de RNA denominados, de acordo com o seu tamanho, de L = *large* (~8.9 kb), M = *medium* (~4.8 kb) e S = *small* (~2.9 kb). O RNA L é de polaridade negativa e codifica a proteína estrutural RdRp. O RNA M é ambisenso e codifica a proteína não estrutural NSm (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) na orientação senso positivo e os precursores das glicoproteínas Gn e Gc no sentido negativo. O RNA S de menor tamanho é ambisenso e sintetiza a proteína NSs (supressora do silenciamento gênico) na orientação senso positivo e a proteína N (na orientação senso negativo) que forma o nucleocapsídeo viral e está envolvida na regulação da transcrição/replicação (De Avila, 1992, Takeda *et al.*, 2002, Bucher *et al.*, 2003, Snippe *et al.*, 2007) (Figura 3). Os oito primeiros nucleotídeos no terminal 3' de cada segmento de RNA são altamente conservados e complementares ao terminal 5' (5'–AGAGCAAU e 3'–UCUGCUUA), permitindo o pareamento das bases e a formação de estruturas pseudo-circulares com maior estabilidade. Esta sequência conservada desempenha um papel importante como promotor da transcrição e replicação.

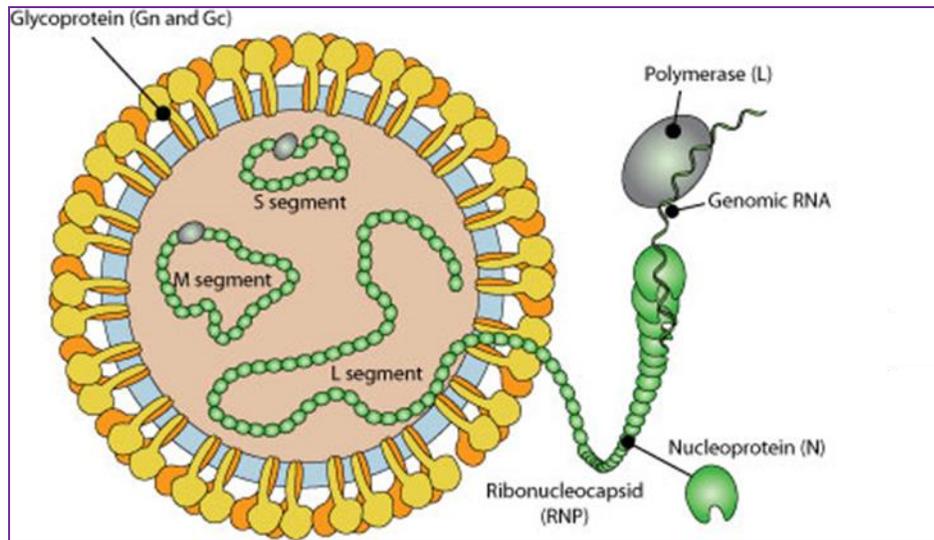


Figura 2 – Representação esquemática de uma partícula de um tospovírus. A membrana lipídica (envelope) contém as glicoproteínas (Gn e Gc). As três estruturas localizadas na parte interna correspondem às ribonucleoproteínas (RNPs), formadas por RNA viral encapsulado pela proteína N e a polimerase (L). (**Fonte:** ViralZone).

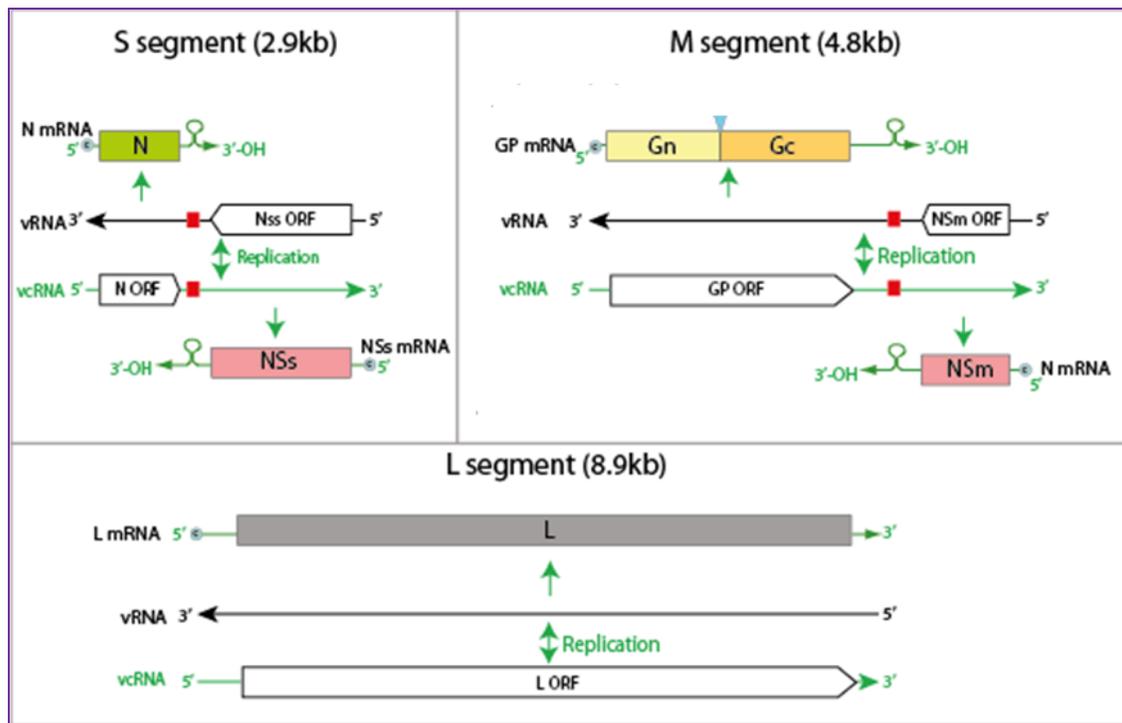


Figura 3 – Estratégia de expressão do genoma de tospovírus. **vRNA** = RNA sentido viral; **vcRNA** = RNA sentido complementar. **N** = proteína do nucleocapsídeo; **Nss** = proteína supressora do silenciamento gênico; **Gc** e **Gn** = glicoproteínas; **Nsm** = proteína de movimento; **L** = RNA polimerase viral; Os segmentos destacados na região 5' de cada transcrito representam a sequência *cap* adquirida durante o processo de *cap-snatching* (**Fonte:** ViralZone).

Ciclo infeccioso de tospovírus – Após ingressar nas células hospedeiras e desagregar o complexo de ribonucleoproteínas (RNPs) (RNA viral, proteína N e RdRp) a polimerase viral inicia a transcrição dos RNAs genômicos, sintetizando os RNAs mensageiros. As proteínas codificadas pelo RNA M e RNA S são traduzidas a partir de RNAs subgenômicos. Isto significa que, antes da tradução, deve ocorrer a transcrição e o processamento dos mRNAs. Para que esse processamento ocorra, o vírus recorre à estratégia de *cap-snatching*, que consiste na remoção de pequenas sequências de mRNAs da planta hospedeira (*caps*), de aproximadamente 12 a 18 nucleotídeos complementares as sequências do vírus e que correspondem ao sítio de ligação dos ribossomos. Estas sequências são em seguida incorporadas aos mRNAs virais, resultando em um significativo comprometimento da tradução dos RNAs da célula hospedeira (**Kormelink et al., 1992; van Knippenberg et al., 2005, Kormelink et al., 2011**) (**Figura 3**). Após o processo de *cap-snatching*, os mRNAs são traduzidos, dando origem às proteínas estruturais e não estruturais que são posteriormente envelopadas no retículo endoplasmático e complexo de Golgi (**Kitajima et al., 1992; Ribeiro et al., 2008**). Embora o processo de replicação ocorra no citoplasma, em uma área conhecida como ‘viroplasma’, pouco se sabe sobre os fatores da célula hospedeira que estão envolvidos na replicação e transcrição, bem como sobre as moléculas presentes no citoplasma que funcionam como doadores das sequências de mRNAs (*caps*) (**Turina et al., 2016**). Durante a replicação, as moléculas de RNA viral se associam com as proteínas N e RdRp para dar origem às progênes infecciosas (RNPs), as quais são frequentemente visualizadas no citoplasma como manchas estriadas dentro ou próximo ao ‘viroplasma’ das células infectadas. Durante os estágios iniciais da replicação, as progênes infecciosas se associam com a proteína NSm para facilitar o transporte através de estruturas tubulares nos plasmodesmas originários da ação da proteína Nsm (**Storms et al., 1995**). Nos estágios finais, as RNPs se deslocam para o retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

Por algum tempo o sítio de maturação/montagem das partículas de TSWV não foi elucidado, entretanto estudos de microscopia eletrônica realizados por **Kitajima (1965)**, **Milne (1970)**, **Ie (1971)** e **Kitajima et al. (1992)** em tecidos infectados já relatavam estruturas típicas associadas com infecções por tospovirus, tais como viroplasmas, agregados de nucleocapsídeos, membranas paralelas pareadas (PPM), partículas duplamente envelopadas (DEVs) e partículas unicamente envelopadas (SEVs) agrupadas com membranas do ER (*Endoplasmic reticulum*). Estes autores também observaram que viroplasmas, nucleocapsídeos agregados e DEVs estão presentes nos estágios iniciais da infecção, enquanto agrupamentos de SEVs ocorrem no final do estágio de maturação. O primeiro trabalho relacionado com a determinação subcelular da localização e formação das partículas virais de TSWV foi realizado por **Kitajima (1965)**. Através de microscopia eletrônica foi verificada a presença de partículas circulares ou elípticas variando de 80-120 µm em diâmetro em células infectadas com tospovírus. Dentro das células infectadas, os vírus são sempre visualizados dentro de uma estrutura ligada à membrana no citoplasma, a qual corresponde a segmentos do ER com tamanho variando de pequenas vesículas, um pouco maior do que as partículas virais, a vesículas extremamente grandes preenchidas com um numeroso conjunto de partículas virais. Foi observado que o formato do ER contendo partículas virais pode variar de circular ou elíptico para alongado, muitas vezes em conexão com o envelope nuclear. **Kitajima (1965)** observou em tecidos foliares, pequenas vesículas contendo um número reduzido de partículas virais concentradas entre as membranas pertencentes ao envelope nuclear. Devido à constante associação com o ER sugeriu-se o relacionamento desta organela com a montagem/síntese das partículas virais de tospovírus. Neste trabalho também foi sugerido o envolvimento dos plasmodesmas na distribuição do vírus para células adjacentes, sugerindo o movimento de ribonucleoproteínas através dos plasmodesmas e não das partículas virais envelopadas, hipótese que foi confirmada posteriormente pelos estudos de **Storms et al. (1995)**.

Em outro estudo **Kitajima et al. (1992)** observaram efeitos citopáticos em tecidos infectados, incluindo acumulação de partículas de TSWV no retículo endoplasmático e a formação de ‘viroplasmas’ e agregados, resultado da acumulação de nucleocapsídeos não envelopados no citoplasma. **Kitajima et al. (1992)** demonstraram a presença de vírus em todos os tipos de células, incluindo células dos tricomas, epiderme, mesófilo, parênquima vascular e vasos do xilema, mas raramente no floema.

Kitajima et al. (1992) observaram que estruturas membranosas derivadas do complexo de Golgi estariam associadas com a formação de partículas virais. Estudos conclusivos sobre a morfogênese de partículas virais de TSWV foram possíveis a partir dos trabalhos de **Kikkert et al. (1999)**. O sítio de maturação/montagem das partículas virais de TSWV foi determinado através de estudos realizados utilizando protoplastos de *Nicotiana rustica*. Utilizando antissoros monoclonais e policlonais específicos em imunofluorescência e microscopia eletrônica, foi demonstrado que o local de formação de partículas de TSWV deveria ser o complexo de Golgi. As glicoproteínas virais acumulam-se no complexo de Golgi antes do processo de envelopamento, pelo qual os nucleocapsídeos virais obtêm uma membrana dupla. Segundo **Kormelink et al. (1992)** as glicoproteínas entram na via secretora devido ao um peptídeo sinal presente no seu N terminal. De acordo com **Kikkert et al. (1999)** o sistema de membranas paralelas pareadas (PPM) derivado do complexo de Golgi corresponde ao local da morfogênese de partículas virais duplamente envelopadas. Em um estágio final de maturação os nucleocapsídeos presentes no citoplasma são envolvidos pelas PPMs para dar origem às partículas virais duplamente envelopadas. Em seguida ocorre a fusão entre DEVs e a fusão de DEVs com membranas do retículo endoplasmático para dar origem a partículas virais maduras com um único envelope (SEVs – *single-enveloped virus particles*) resultando na formação de grandes vesículas dentro do citoplasma. As partículas virais envelopadas permanecem nesta

vesícula, onde estão disponíveis para aquisição e transmissão pelo inseto vetor (**Kikkert et al., 1999; 2001**) (**Figura 3**). De acordo com **Sin et al. (2005)** as partículas virais envelopadas são necessárias para a transmissão do vírus pelos tripses, mas não para infecção das plantas, pois isolados virais incapazes de formar partículas envelopadas ainda são infectivos, mas não são transmissíveis.

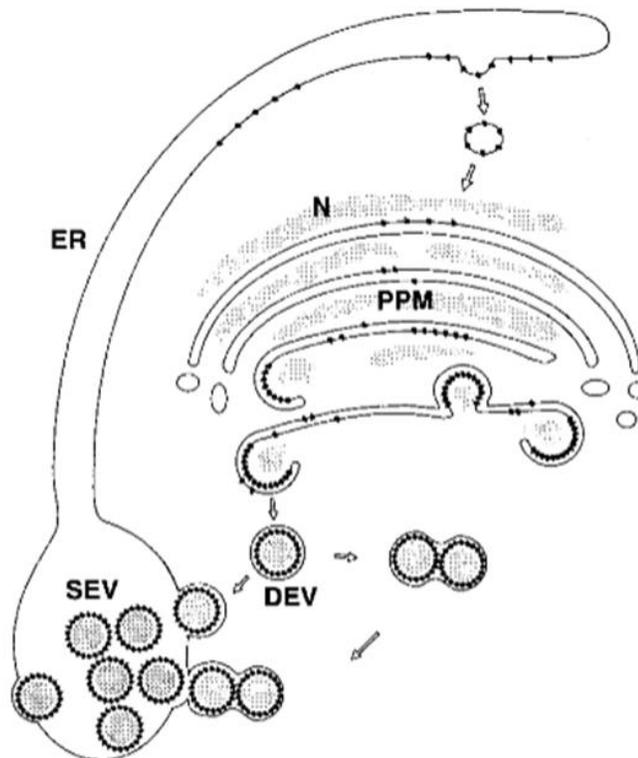


Figura 4 – Representação esquemática da morfogênese das partículas de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) na célula da planta hospedeira. ER = retículo endoplasmático; SEV = partículas envelopadas; DEV = partículas duplamente envelopadas; N = nucleoproteínas; PPM = membranas paralelas pareadas (**Kikkert et al., 1999**).

Ribeiro et al. (2008) estudaram a localização e o comportamento das glicoproteínas virais Gn e Gc, através da expressão transiente em protoplastos vegetais. Gc expressa separadamente de Gn e foi observada apenas em associação com o ER, enquanto Gn foi encontrada tanto dentro das membranas do ER quanto no complexo de Golgi. Após a coexpressão, ambas as glicoproteínas foram encontradas no sítio de exportação do ER (**ERES – ER export sites**) e, posteriormente no

complexo de Golgi. Estes resultados demonstram o papel da proteína Gn para evitar a retenção da proteína Gc no ER, possivelmente devido à heterodimerização, levando a uma mobilização espacial de Gc do ER para ERES. Os ERES são regiões especializadas dentro do ER envolvidas na triagem de proteínas para o transporte do ER para o complexo de Golgi. Este transporte é mediado por COPII (proteína de revestimento II) ([Hanton et al., 2006](#)). Em um trabalho posterior [Ribeiro et al. \(2009\)](#) demonstraram a dependência das glicoproteínas pelo COPII para o transporte entre o ER e o complexo de Golgi. Adicionalmente, ambas as glicoproteínas, isoladas ou coexpressas, são capazes de modificar a morfologia das membranas de ER e do complexo de Golgi, resultando em estruturas pleomórficas e/ou pseudocirculares ([Kitajima et al., 1992](#); [Kikkert et al., 1999](#); [Ribeiro et al., 2008](#)). Em adição, semelhante a estudos reportados com vários bunyavirus que infectam animais ([Andersson et al., 1997](#); [Matsuoka et al., 1996](#); [Ronnholm, 1992](#)), as glicoproteínas combinadas contêm todas as informações necessárias para o seu transporte e retenção no complexo de Golgi. Com relação ao TSWV as glicoproteínas guiam o processo de montagem de partículas virais ([Ribeiro et al., 2009](#))

Além do envolvimento das glicoproteínas no processo de montagem da partícula viral, as demais proteínas de tospovirus também desempenham papéis cruciais em diferentes etapas do ciclo infeccioso. A proteína NSs é reconhecida como uma forte supressora do silenciamento gênico ([Takeda et al., 2002](#)). No entanto, por algum tempo, não foi possível identificar qual etapa do mecanismo de silenciamento era suprimido por esta proteína. [Hagen et al. \(2011\)](#) demonstraram que a proteína NSs não impede que enzimas ‘dicer’ fragmentem os dsRNAs provenientes dos intermediários de replicação viral. Através de técnicas de sequenciamento massal (Illumina RNAseq), usando exclusivamente coleções de pequenos RNAs (sRNAs) [Hagen et al. \(2011\)](#) foram capazes de montar 99% do genoma completo dos três segmentos genômicos de TSWV. Esses resultados sugerem que a atuação da proteína NSs ocorre em uma etapa

posterior ao do funcionamento das proteínas ‘dicer’. Um estudo independente mostrou que proteínas NSs de quatro espécies de tospovirus (TSWV, GRSV, INSV e TYRV) foram capazes de se ligar (em um experimento usando dsRNAs longos e dsRNAs curtos) de modo mais eficiente a dsRNAs curtos, indicando que estas proteínas podem atuar como competidores do complexo RISC. Essa característica da NSs atrapalharia a captura e degradação de RNAs virais específicos pelo complexo RISC (que é o principal mecanismo de defesa celular pela maquinaria de RNAi) (Schnettler *et al.*, 2010). Ou seja, atuação da NSs na supressão do silenciamento gênico está conectada com as funções do complexo RISC, demonstrada pela afinidade de NSs com dsRNAs curtos que são os alvos principais do complexo RISC. Estudos realizados por Lokesh *et al.* (2010) usando a NSs de GBNV demonstram que essa proteína possui dois tipos de funções enzimáticas: NTPase/dATPase e 5’ α -fosfatase, sugerindo que além de atuar como supressora de respostas de defesa ela poderia exercer funções na replicação e transcrição viral. A função fosfatase seria direcionada para ácidos ribonucleicos e pode ser a base para camuflar os fragmentos de RNAs (fragmentados pela enzima ‘dicer’) do complexo RISC, pois este é incapaz de reconhecer e carregar fragmentos de RNA que não tenham a extremidade 5’ fosforilada (Lokesh *et al.*, 2010). Dessa forma a proteína NSs atuaria no processo infeccioso através da supressão dos mecanismos de defesa basal da planta, possibilitando a replicação, transcrição e tradução das proteínas virais.

Feng *et al.* (2013) demonstraram interações da proteína N com o complexo actina/miosina através da proteína miosina XI-K no ER formando complexos móveis possivelmente associados com tráfego das proteínas virais para montagem de partículas e infecção célula a célula.

O papel desempenhado pela proteína NSm no processo de infecção foi recentemente demonstrado com dados indicando sua afinidade por membranas hospedeiras. Foi verificado que

a NSm está associada (mas não integrada) nas membranas provavelmente através da região central hidrofóbica (Silva *et al.*, 2001) em conjunto com o domínio *coiled-coil* (Singh *et al.*, 2014) com ambos terminais (N e C) estando orientados na direção da face citoplasmática das membranas. Essa associação às membranas é provavelmente necessária para a interação com a proteína N, de modo a direcionar os complexos RNP para o plasmodesmata (Leastro *et al.*, 2015). As observações de que a NSm está associada com as membranas do ER foram recentemente demonstradas por Dietzgen *et al.* (2012) e Leastro *et al.* (2015) para isolados de TSWV. Estes autores observaram que a proteína NSm interage fisicamente com a membrana do ER por meio dos plasmodesmas e que esta interação é necessária para a movimentação da proteína NSm entre as células (movimento célula a célula). Por sua vez, o tráfego intercelular de NSm não envolve o complexo de Golgi (Feng *et al.*, 2016).

Apesar de um conjunto de estudos demonstrarem que as proteínas de tospovirus estão associadas com filamentos de actina e miosina bem como membranas, ER e complexo de Golgi, pouco ainda se sabe sobre o sítio ou o processo de replicação viral. Um estudo recente sobre a replicação e transcrição de TSWV indicou que o fator de alongação da tradução eEF1A pode estar envolvido também na síntese de RNA. Além de sua função na tradução, esta proteína tem diversas funções não canônicas, incluindo facilitar a síntese de RNA em alguns vírus vegetais (Komoda *et al.*, 2014).

Transmissão e vetores das espécies de *Tospovirus* – Espécies de *Tospovirus* são transmitidas por insetos chamados de tripes (Ordem: Thysanoptera; família: Thripidae). A relação de transmissão é caracterizada como sendo do tipo circulativa– propagativa (Wijkamp *et al.*, 1995). Tripes adultos não se tornam virulíferos mesmo depois de prolongados períodos de alimentação em plantas infectadas (Van De Wetering *et al.*, 1996). Os tripes somente adquirem o vírus

durante o primeiro e segundo estágios larvais, quando se alimentam de folhas infectadas e permanecem virulíferos durante todo o seu ciclo de vida (**Wijkamp et al., 1995**) (**Figura 5**). O ciclo de vida dos adultos alados varia de 30 a 45 dias, período pelo qual podem transmitir o vírus. Depois da aquisição pelo tripses, o vírus chega até as células epiteliais do intestino médio, onde se replica. A partir deste ponto, as partículas virais se deslocam até as glândulas salivares (**Nagata et al., 1999**). As glicoproteínas Gc e Gn foram identificadas como responsáveis pela interação do vírus com as células do intestino médio do inseto, bem como com a circulação do mesmo dentro do corpo do vetor (**Wijkamp et al., 1995**). Após a transmissão do vírus para a célula de uma planta hospedeira, o vírus é liberado de sua membrana e o nucleocapsídeo adentra o citoplasma. Nesta fase, o RNA viral é transcrito ou replicado pela RNA polimerase dependente de RNA (**Hull, 2002**).

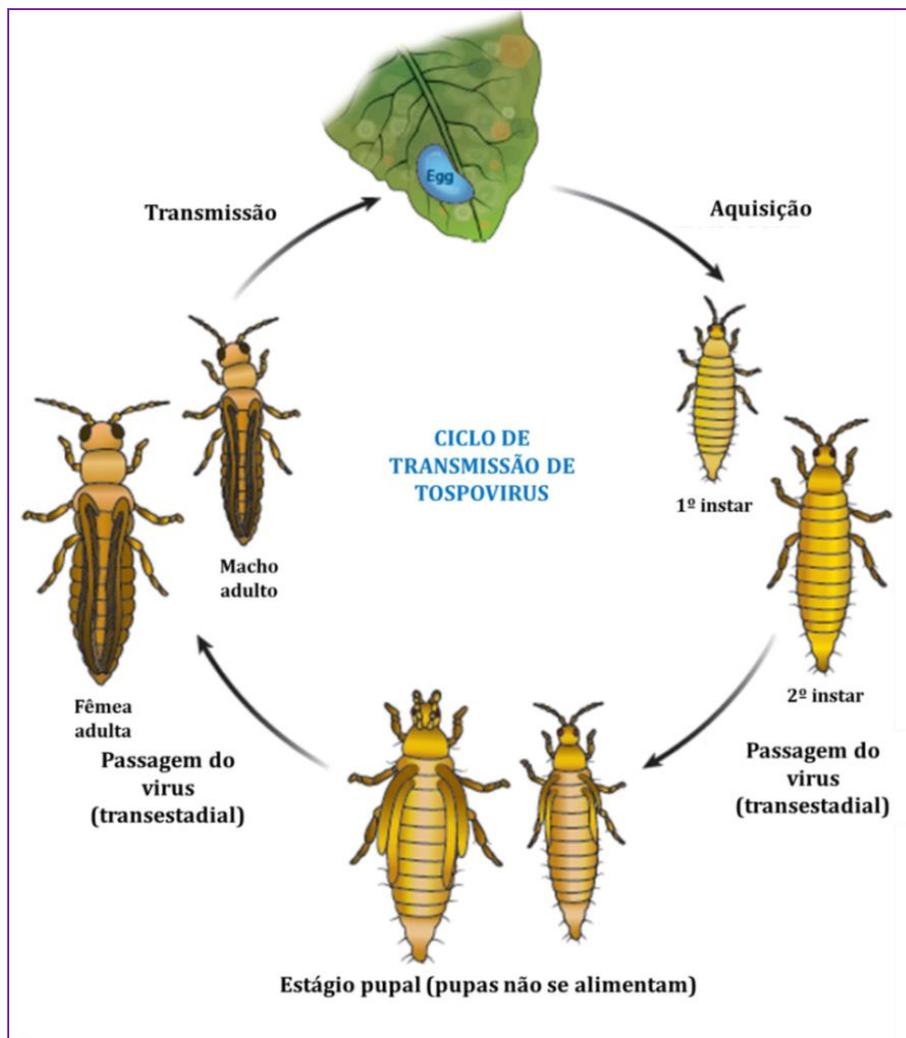


Figura 5 – Ciclo de vida dos tripses e ciclo de transmissão de tospovírus: Os tripses adultos ovipositam no tecido vegetal e dentro de alguns dias as larvas de primeiro instar emergem. A aquisição do vírus ocorre durante as fases larvais (1º e 2º instars). Os estádios pupais não se alimentam, e assim não adquirem nem transmitem o vírus. O vírus é transferido transestadialmente. Os adultos emergem e podem se dispersar amplamente. Somente os tripses adultos (machos e fêmeas) que adquiriram o vírus durante sua fase larval podem transmitir tospovírus (Adaptado de [Rotenberg et al., 2015](#)).

Entre as 5.000 espécies de tripses descritas na literatura ([Mound, 1996](#)), 15 foram identificadas como vetores de tospovírus. As espécies *Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei*, *Thrips tabaci* e *T. palmi* já foram identificadas no Brasil ([Nagata et al., 1999](#)). *Frankliniella schultzei* é o mais eficiente vetor de espécies de tospovírus nas condições brasileiras. *Frankliniella schultzei* foi identificada como a principal espécie de inseto transmissor de GRSV

em condições naturais, explicando a prevalência desta espécie viral nos plantios de tomateiro do Brasil (Nagata *et al.*, 2004). O controle das tospovirose via controle destes vetores é difícil, pois métodos físicos, químicos e biológicos não são muito eficientes para evitar a dispersão dessas doenças. Desta forma, a resistência genética se tornou a principal ferramenta para controle das tospovirose em hortaliças, assim como para a grande maioria dos vírus que infectam diversas culturas pelo mundo (Roselló *et al.*, 1996).

Sistemas de defesa na interação planta-patógeno – As plantas são naturalmente atacadas e exploradas por uma ampla variedade de micro-organismos e artrópodes uma vez que representam um reservatório abundante de nutrientes. Neste cenário, um elemento essencial na evolução das plantas foi o desenvolvimento de um sistema de defesa eficaz contra uma ampla gama de patógenos nocivos. Em contrapartida, os patógenos utilizam diversos mecanismos para conseguir superar as barreiras de defesa impostas pela planta hospedeira e obter sucesso nos processos de colonização e infecção. Esses mecanismos evolucionários antagônicos resultam em uma permanente pressão de seleção sobre a planta para impulsionar novos ciclos de evolução em direção à diversificação de fatores de resistência que, por sua vez, estimula uma permanente evolução no patógeno no sentido de adquirir novos fatores de virulência (Jones & Dangl, 2006).

As plantas, ao contrário dos animais não possuem células de defesa móveis e um sistema imunológico somático adaptativo (imunidade adquirida). Como compensação, as plantas contam com uma ‘imunidade inata’ com os subsequentes sinais sistêmicos emitidos a partir das células e tecidos localizados nos sítios primários de infecção (Dangl & Jones, 2001). A imunidade inata conta com receptores especializados que podem ser divididos em dois grandes grupos: os receptores de reconhecimento padrão (PRRs – *Pattern Recognition Receptors*) e as proteínas de resistência do tipo NBS-LRR (NBS-LRR – *Nucleotide-Binding Sites – Leucine Rich Repeats*)

(Nurnberger *et al.*, 2004). Segundo Jones & Dangl (2006), a visão mais atual do sistema de imunidade das plantas pode ser representada por um modelo de quatro fases denominado “zig-zag” (Figura 6).

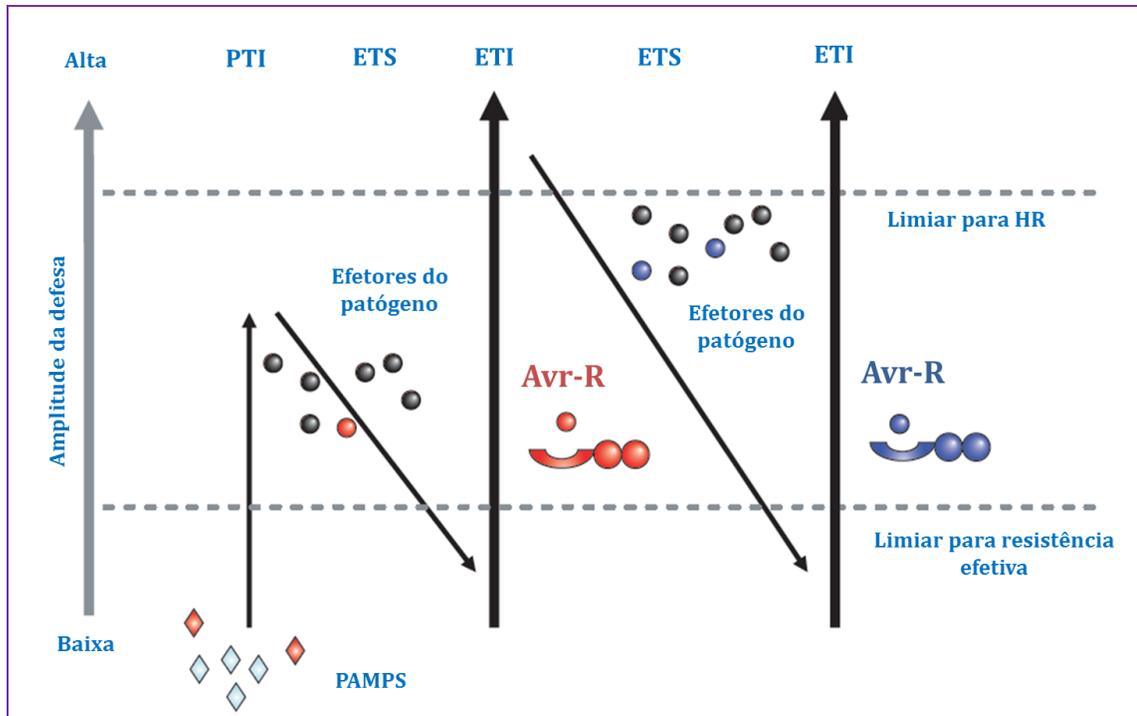


Figura 6 – Modelo ‘Zig-Zag’ ilustrando o sistema imune das plantas. Na **Fase #1**, as plantas detectam os PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) via PRRs (*Pattern recognition receptors* – PRRs), ativando a imunidade PTI (*PAMP-triggered immunity*). Na **Fase #2** os patógenos mobilizam efetores que interferem na PTI, resultando na *effector-triggered susceptibility* (ETS). As plantas, por sua vez, evoluem em resposta aos efetores e adquirem genes de resistência (R) capazes de reconhecer os efetores (em vermelho), ativando assim a *effector-triggered immunity* (ETI) (**Fase #3**). A pressão exercida sobre determinado efetor estimula os patógenos para aquisição de novos efetores (em azul) que podem suprimir a ETI (**Fase #4**). A seleção natural pode favorecer o surgimento de novos alelos dos genes R na planta capaz de reconhecer esses novos efetores, resultando novamente em ETI (Modificado de Jones & Dangl, 2006).

Em resposta ao ataque de patógenos, as plantas desenvolveram duas linhas de defesa (Jones & Dangl 2006; Chisholm *et al.*, 2006). A primeira estabelece um sistema de defesa basal contra todos os patógenos em potencial. O sistema de defesa basal utiliza proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática das células vegetais (*Pattern recognition receptors* – PRRs)

que reconhecem estruturas microbianas evolucionariamente conservadas que são denominadas na literatura como PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou MAMPs (*Microbial-associated molecular patterns*) (Zipfel, 2008). De forma semelhante, as plantas respondem às moléculas endógenas liberadas em suas células e tecidos após invasão do patógeno, tais como oligômeros de parede celular ou fragmentos cuticulares, denominados de DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) (Boller & Felix, 2009; Collier *et al.*, 2011; Deller *et al.*, 2011). PAMPs/MAMPs referem-se a quaisquer tipos de componentes estruturais, extremamente conservados e que, quase invariavelmente, são essenciais à sobrevivência de um dado patógeno. Como exemplo de PAMPs/MAMPs pode-se citar a flagelina bacteriana, fator de alongação bacteriano–Tu (EF-Tu), lipopolissacarídeos, peptidoglicana, β -glucanos, ergosterol e quitina de fungos (Boller & Felix, 2009). Os receptores PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) envolvidos no reconhecimento dos PAMPs/MAMPs são divididos em dois principais grupos: receptores do tipo proteína quinase e, menos abundantes, os receptores denominados *Receptor-like proteins* (Dodds & Rathjen, 2010).

Após o reconhecimento dos PAMPs na superfície celular da planta pelos receptores, PRRs, os processos que conduzem a PTI (*PAMP-triggered immunity*) são iniciados gerando a sinalização em cascata MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*). A sinalização MAPK conduz à ativação de fatores de transcrição do tipo WRKY, importantes reguladores na defesa de plantas (Eulgem & Somssich, 2009; Pandey & Somssich, 2009). Durante os processos de PTI ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), alterações nos níveis de Ca^{2+} no citoplasma, deposição de calose na parede celular, produção de etileno, e a expressão de genes relacionados com a defesa da planta que, em conjunto, levam a uma interrupção ou barreira ao crescimento do patógeno invasor (He *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2007; Boller & Felix,

2009) (Figura 7). A ativação de PTI impede a colonização do hospedeiro pelo patógeno, o que confere resistência a um amplo espectro de patógenos em potencial.

Ao longo desse processo co-evolucionário, os patógenos desenvolveram estratégias para contornar os aparatos de defesa da planta. Visando suprimir ou contornar PTI, os fitopatógenos desenvolveram um arsenal de produtos gênicos chamados “efetores” e que são capazes de alterar o estado fisiológico da planta hospedeira favorecendo o processo infeccioso. Os efetores são codificados pelos chamados genes de avirulência (*Avr*) do patógeno. As moléculas efectoras atuam para interferir negativamente ou mesmo desativar as respostas de defesas das plantas, permitindo a colonização do patógeno (Hammond-Kosack *et al.*, 2007). Como resposta evolucionária aos efetores, as plantas passaram a reconhecer, na maioria das vezes de maneira específica, alguns desses produtos gênicos dos patógenos. Este reconhecimento específico de efetores desencadeia a imunidade vegetal do tipo ETI (*Effector-triggered immunity*).

Neste contexto, o mecanismo de detecção de patógenos via ETI é considerado como a segunda linha de defesa em plantas e baseia-se nesse reconhecimento intracelular específico de proteínas efectoras (*Avr*) (Jones & Dangl, 2006; Chisholm *et al.*, 2006) (Figura 7). Eventos de reconhecimento são mediados principalmente por uma classe de proteínas receptoras que contém domínios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina (NB-LRR). Proteínas NBS-LRR conferem resistência contra diversos patógenos, incluindo fungos, oomicetos, bactérias, vírus e insetos. Este importante mecanismo de percepção de agentes patogênicos baseado em genes de resistência (R) em plantas, cujos produtos conferem reconhecimento de proteínas de avirulência (*Avr*) cognatas no patógeno é a base biológica e fisiológica que sustenta a teoria gene a gene, introduzida por H. H. Flor na década de 1940.

Este modo de reconhecimento dos produtos gênicos R-*Avr* leva a uma dinâmica coevolutiva entre plantas e patógenos que é bastante diferente da PTI. Em contraste com

PAMPs/MAMPs, os efetores são caracteristicamente variáveis e, muitas vezes, dispensáveis pelos patógenos. Desta forma, observamos uma extrema diversidade de receptores ETI entre as espécies de plantas hospedeiras, enquanto que algumas das funções PRRs são altamente conservadas entre as famílias botânicas. Esta imunidade desencadeada por efector (ETI) é uma resposta rápida e intensa, muitas vezes associada com uma reação de hipersensibilidade (HR). PTI é geralmente eficaz contra patógenos não adaptados em um fenômeno chamado de resistência de não hospedeiro enquanto que ETI é ativo contra patógenos adaptados ao hospedeiro (**Dodds & Rathjen, 2010**).

Genes R dominantes – Os diferentes modelos de interação planta-patógeno estudados até o presente momento, indicam que o produto de um único gene de resistência dominante (R) percebe diretamente (ou indiretamente) a presença de um patógeno através da identificação específica de uma molécula efetora do patógeno. Os efetores quando são reconhecidos pelos diferentes genes R passam a ser denominados de fatores de avirulência (Avr), levando ao processo de ETI. A expressão fenotípica controlada por genes R é geralmente associada com uma (concomitante) indução de morte celular programada (visualizada pelo rápido aparecimento de lesões necróticas ou resposta de hipersensibilidade – HR) ou em raras ocasiões, resistência extrema (RE), durante o qual não é observada claramente respostas de necrose do tecido invadido (**de Ronde et al., 2014**).

Genes R dominantes basicamente podem ser agrupados, de maneira simplificada e pragmática, em duas grandes classes: os que codificam proteínas NBS-LRRs e todos os outros genes apresentando diferentes componentes estruturais. O fato dos genes R conferirem resistência a diferentes agentes patogênicos só é possível devido ao recrutamento, em sua composição estrutural, de vários domínios que exibem funções amplas no processo de defesa. A maioria dos

genes R contém um subdomínio central de ligação a nucleotídeos (NB – *nucleotide-binding*) como parte de uma classe estrutural mais ampla chamada domínio NB-ARC. Este domínio também está presente no fator de ativação de protease apoptótica humana 1 (APAF-1) e na proteína CED-4 de *Caenorhabditis elegans* (Van der Biezen & Jones, 1998a). Na região C-terminal ao domínio NB-ARC encontra-se um domínio rico em repetições do aminiácido leucina (LRR – *leucine-rich repeats*), que é, por vezes, seguido por uma extensão de comprimento variável. Este grupo de proteínas R é coletivamente referido como proteínas NBS-LRR (Whitham *et al.*, 1994). Todas as proteínas NBS-LRR são creditadas a atuarem intracelularmente.

Proteínas NBS-LRR são divididas em duas classes com base no seu domínio N-terminal. Se esta região apresentar identidade com o domínio da proteína receptora *Toll* de *Drosophila* e com o receptor interleucina-1 (IL-1R) em mamíferos, é chamado de domínio TIR (Whitham *et al.*, 1994) e estas proteínas são referidas como TIR-NB-LRR ou proteínas TNL (classe TNL). Proteínas com ausência de inequívoca identidade estrutural com o domínio TIR na extremidade N-terminal são agrupadas com o domínio *coiled-coil* (CC) no grupo não-TIR-NBS-LRR e são coletivamente referidas como CC-NB-LRR ou proteínas CNL (classe CNL). Curiosamente, os genes R que contêm um domínio N-terminal TIR foram encontrados, até o presente momento, apenas nos genomas de dicotiledôneas, mas não em monocotiledôneas. Por sua vez, as proteínas do tipo CC-NB-LRR podem ser encontradas tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas (Collier *et al.*, 2011).

Além dos genes que foram isolados e confirmados como genes R, numerosos homólogos foram identificados em programas de sequenciamento e anotação de genomas vegetais. Em *Arabidopsis*, a classe TNL forma o maior grupo de proteínas NBS-LRR (Meyers *et al.*, 1999). Nas solanáceas, a maioria das proteínas NBS-LRR pertence à classe CNL. Apenas três proteínas

TNL foram identificadas correspondendo aos genes *Bs4* (em tomate) ([Bonas et al. 1993](#)), *Gro1-4* (em batata) ([Erickson et al., 1999](#)), e o gene *N* (em fumo) ([Erickson et al., 1999](#)), que conferem resistência a *Xanthomonas vesicatoria*, *Globodera rostochiensis* e *Tobacco mosaic virus*, respectivamente.

Muitos estudos têm demonstrado que o domínio LRR está sob seleção diversificadora (= *disruptive* ou *diversifying selection*), onde os fenótipos extremos são favorecidos sobre fenótipos intermediários. Esse modelo de processo evolucionário é compatível com receptores de superfície celular que podem estar envolvidos na percepção de produtos gênicos do tipo Avr dos patógenos ([Meyers et al., 1998](#); [Noel et al., 1994](#); [Mucyn et al., 2006](#), de [Oliveira et al., 2016](#)). A hipótese de que o domínio LRR confere reconhecimento específico de produtos gênicos do tipo Avr foi confirmada experimentalmente e essa especificidade pode ser alterada com algumas pequenas mudanças (mutações) de um novo gene *Avr* ([Ellis et al., 1999](#); [Wulff et al., 2001](#); [Van der Hoorn et al., 2001](#); [Rairdan & Moffett, 2006](#); de [Oliveira et al., 2016](#)). Um grau significativo de seleção diversificadora também foi observado na região N-terminal de algumas proteínas do grupo NBS-LRR, sugerindo que esta região é também importante para a produção de novas especificidades de reconhecimento de fitopatógenos, o que foi confirmado experimentalmente ([Ellis et al., 1999](#); [Luck et al., 2000](#); [Mondragon-Palomino, 2002](#)). Em adição a um papel na especificidade de reconhecimento, o domínio N-terminal pode estar envolvido no recrutamento e ativação de componentes de sinalização. Com os domínios LRR e o N-terminal conferindo o reconhecimento do patógeno e a sinalização, o centro de NB-ARC é especulado atuar como um “interruptor molecular” (*molecular switch*) que controla o estado de ativação da proteína ([Takken et al., 2006](#)).

Embora as funções para os três principais domínios tenham sido investigadas em algumas proteínas R e alguns mecanismos de ação desses genes terem sido propostos, existem muitas

diferenças que impossibilitam a elaboração de um único modelo de ativação que se aplique para todos os genes R (**Takken & Govere, 2012**). As proteínas NBS-LRR carecem de conservação e são significativamente mais diversificadas do que o esperado dentro de um modelo de deriva genética aleatória. Isto sugere que existem pressões seletivas que promovem a evolução de novas especificidades do hospedeiro, para o reconhecimento de proteínas do tipo Avr de diferentes patógenos. Agrupamentos físicos (= *clustering*) de genes NBS-LRR são muito comuns em diversos genomas vegetais devido a duplicações em tandem e duplicações ectópicas, seguidas por rearranjos locais e conversão de genes, processos importantes que influenciam a evolução e a geração de diversidade gênica e/ou alélica dentro desta família (**Nurnberger et al., 2004**).

As proteínas de resistência (R) do tipo NBS-LRR atuam intracelularmente e apenas um número limitado delas atuam extracelularmente. Essa outra classe de proteínas R possuem um domínio extracelular de repetições ricas em leucina (eLRR) no seu N-terminal. Este domínio eLRR está ligado através de um domínio transmembrana a uma região C-terminal citoplasmático. Quando o domínio citoplasmático contém proteínas do tipo quinase a proteína R é classificada na classe LRR-RLK (*Leucine-Rich Repeat- Receptor-Like Kinases*). Na ausência deste domínio, a proteína é classificada na classe LRR-RLP (*Leucine-Rich Repeat-Receptor-Like Proteins*) (**Van Ooijen et al., 2007**). O receptor transmembrana denominado de NIK1 (*nuclear shuttle protein (NSP)-interacting kinase 1*) pertence a classe LRR-RLK e possui papel importante na resposta de defesa de plantas contra begomovírus (**Shiu & Bleeker, 2001; Dievart & Clark, 2004**). **Fontes et al.** (2004) demonstraram a interação da proteína NSP (*nuclear shuttle protein*) de geminivírus com as proteínas NIK1, NK2 e NIK3 de *Arabidopsis*. A interação NSP-NIK sugere que a proteína hospedeira NIK poderia funcionar como o gene R e a proteína NSP como o fator de avirulência (Avr) responsável por desencadear a resistência a geminivírus (**Garrido-Ramirez et al., 1998**).

Nos últimos anos, vários genes de resistência e os genes correspondentes de avirulência foram clonados, por exemplo, os genes *RTM1/RTM2* e *HRT* em *Arabidopsis* spp., que conferem resistência a *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Turnip crinckle virus* (TCV), respectivamente (Cooley *et al.*, 2000). No tomateiro, três genes de resistência a vírus foram clonados (*Tm-2-2*, *Sw-5* e *pot-1*), que conferem resistência a *Tomato mosaic virus* (ToMV), TSWV e *Potato virus Y* (PVY), respectivamente (Weber *et al.*, 1993; Brommonschenkel *et al.*, 2000; Spassova *et al.*, 2001; Lanfermeijer *et al.*, 2003). Recentemente foi descrita a clonagem do gene *Ty-1* de tomateiro que confere resistência ao *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Este gene codifica para uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e é proposto para conferir resistência ao TYLCV, amplificando o sinal de RNAi (Verlaan *et al.*, 2013).

Alguns genes R conferindo resistência contra vírus que não pertencem à classe NBS-LRR, têm sido descritos, por exemplo, *RTM1*, *RTM2* e *RTM3*. Estes genes de resistência foram identificados em *Arabidopsis* e evitam a disseminação sistêmica de vários potyvírus. Nenhuma interação direta ocorre entre as proteínas *RTM* com a proteína CP (Avr) de potyvírus. Além disso, também não há indução de HR ou a produção de ácido salicílico (AS), como comumente observado com respostas de resistência mediada por NB-LRR (Cosson *et al.*, 2012). Um gene de resistência recentemente identificado, *JAX*, codifica uma lectina que se assemelha ao gene de resistência *RTM* e funciona amplamente contra potexviroses em *Arabidopsis*, indicando um papel importante de lectinas na imunidade de plantas (Yamaji *et al.*, 2012). Outro tipo distinto de gene é o *Tm-1*, encontrado na espécie selvagem de tomate *S. habrochaites*, que codifica uma proteína que contém um “TIM-barrel” que se liga as proteínas de replicação do *Tomato mosaic virus* (ToMV) e, assim, inibe a replicação do RNA (Ishibashi *et al.*, 2012). Também aqui, nenhuma resposta típica associada a genes NBS-LRR, como RH, é induzida. Ambos *RTM* e *Tm-1* parecem desempenhar um papel na inibição de um passo específico e necessário para a infecção

bem sucedida do vírus. No entanto, ainda permanece por ser determinado se estes genes representam nova classe de genes dominantes de resistência.

Modelos de reconhecimento dos genes R – Embora a hipótese gene a gene esteja firmemente apoiada pela caracterização de vários pares de genes R/Avr, o mecanismo básico de percepção ainda tem sido objeto de debate e de avaliações experimentais. Inicialmente, acreditava-se que os produtos dos genes R atuavam como receptores que interagiam diretamente com os produtos dos genes do tipo Avr (**Keen, 1990**). De fato, a ligação direta de algumas combinações R-Avr foi encontrada de acordo com este modelo de interação receptor-ligante (**Jia et al, 2000; Deslandes et al, 2003; Dodds et al, 2006; Ueda et al., 2006**). Embora tenha sido possível identificar os receptores envolvidos em tais interações, na maioria dos casos, é necessário a cooperação de algumas proteínas adicionais do hospedeiro para desencadear a resposta de resistência. Este mecanismo é explicado pelo chamado “Modelo Guarda” que é uma extensão do modelo gene a gene original (**Głowacki et al., 2011**). Esse modelo prediz que as proteínas “Guardas R” apresentam como função principal o monitoramento de uma distinta proteína acessória na planta hospedeira, denominada de “Guardee”, a qual é, de fato, alvo dos efetores do patógeno. Interação da proteína “Guardee” com efetores do patógeno resulta em modificações estruturais e funcionais nessas proteínas acessórias, culminando no desencadeamento da resposta de resistência do hospedeiro (**Van der Biezen & Jones, 1998b; Dangl & Jones, 2001**) (**Figura 7**). O exemplo mais bem estudado de modificação de um alvo do hospedeiro por proteínas do tipo Avr resultando na ativação de proteínas R é a fosforilação ou clivagem da proteína RIN4 de *Arabidopsis* pelos genes *AvrB/AvrRpm1* e *AvrRpt2* da bactéria *Pseudomonas syringae* (**Mackey et al., 2002; Kim et al., 2005**). Estes eventos desencadeiam a ativação das proteínas codificadas pelos genes de resistência *Rpm1* e *Rps2*. O mecanismo de percepção indireta de efetores

postulado pelo “Modelo Guarda” explica como múltiplos efetores podem ser percebidos por uma única proteína R, permitindo assim que um repertório relativamente pequeno de genes R apresente uma maior amplitude de eficiência (Dangl & Jones, 2001).

Além do exemplo descrito acima, o reconhecimento indireto de Avr foi também proposto para a proteína *Mi-1.2* de tomate. Essa proteína apresenta propriedades peculiares, uma vez que confere resistência em tecidos diversos (folhas e raízes) a patógenos e artrópodes altamente diversos tais como os nematoides das galhas (*Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*), o pulgão da batata (*Macrosiphum euphorbiae*) e o biótipo Q da mosca branca (*Bemisia tabaci*) (Nombela *et al.*, 2003, Vos *et al.*, 1998). Uma seleção de mutantes identificou que o gene *Rme-1* (não ligado ao gene *Mi-1.2*) também é necessário para a resistência contra *M. incognita*, sendo, portanto, um candidato “Guardee” do gene *Mi-1.2*, uma vez que *Rme-1* não está envolvido em outras vias de genes R e atua na mesma cascata de sinalização de *Mi-1.2* (Martinez *et al.*, 2004).

Na ausência de um gene R funcional, a seleção natural tende a atuar no sentido de que o gene “Guardee” reduza a sua afinidade de interação com o efector, podendo, desta forma, permitir a detecção de eventuais modificações estruturais do efector. No entanto, na presença de um gene R funcional, a seleção natural deverá favorecer genes “Guardees” com maior interação com um efector específico para aprimorar os sistemas de percepção do patógeno. Estas duas pressões de seleção antagônicas resultam em uma situação instável (do ponto de vista evolucionário) dos genes “Guardees”, que poderia ser flexibilizada a partir da evolução de uma proteína do hospedeiro denominada “Decoy” (Van der Hoorn & Kamoun, 2008). De acordo com este modelo, proteínas específicas que são semelhantes aos alvos dos efetores são geradas pela planta em algumas interações planta-patógeno (Głowacki *et al.*, 2011). As proteínas “Decoys” são

especializadas na percepção de efetores dos patógenos por proteínas R, mas não possuem nenhuma função na expressão da doença ou da resposta de resistência.

Assim os genes e proteínas do tipo “Decoy” mimetizam os alvos dos efetores para interceptar o patógeno nos eventos iniciais de reconhecimento da célula hospedeira. “Decoys” podem evoluir a partir de eventos de duplicação de genes codificadores de proteínas originalmente utilizadas como alvos dos efetores, seguido pela evolução subsequente ou independente, imitando ou simulando os alvos originais dos efetores (mimetismo) (**Figura 7**). O Modelo “Decoy” implica que o alvo do efector monitorado pela proteína R é um produto gênico que imita o alvo operativo da proteína efetora. Em comparação com o modelo “Guarda”, o modelo “Decoy” funciona apenas na percepção de efetores sem contribuir para o “fitness” do patógeno na ausência de sua proteína R cognata. No “Modelo Guarda” a manipulação dos “Guardees” pelo efector beneficia o patógeno na ausência da proteína R. Através da competição funcional com os alvos operativos em ligação com efetores do patógeno, os genes “Decoys” podem até mesmo reduzir a virulência e o “fitness” dos patógenos (**Van der Hoorn & Kamoun, 2008**).

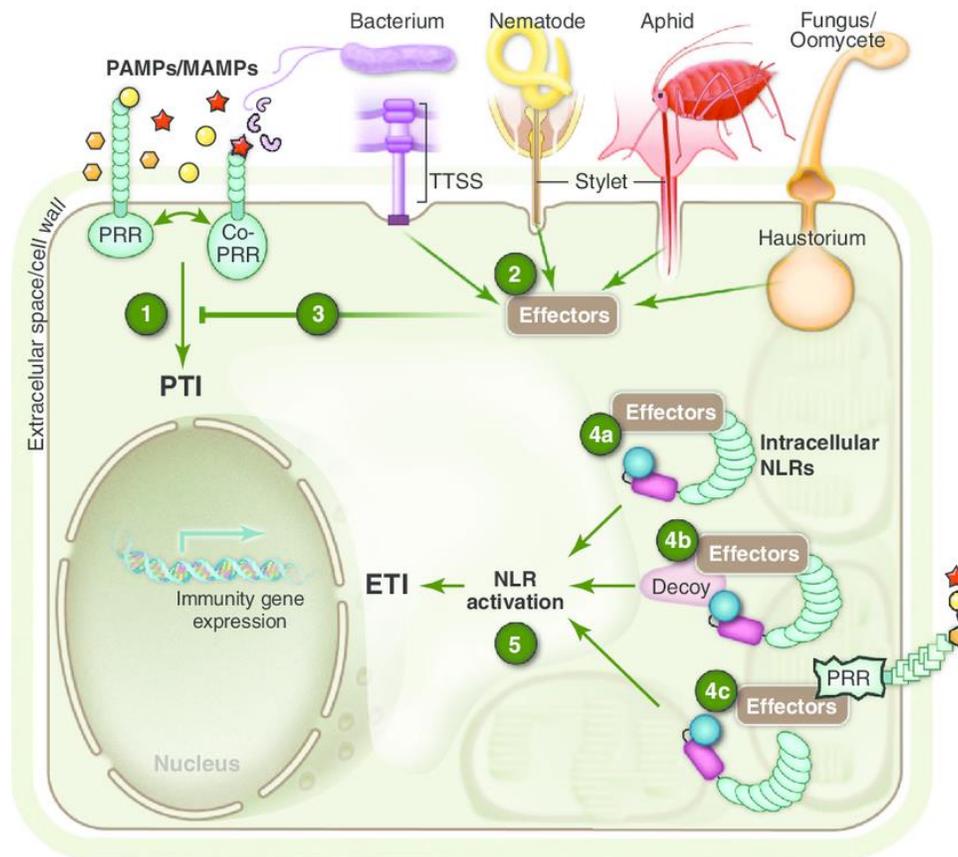


Figura 7 – Visão geral do sistema de imunidade das plantas. Patógenos e pragas com diferentes estilos de vida e pertencentes a distintas classes taxonômicas (bactérias, nematoides, artrópodes, fungos e oomicetos) expressam PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) e MAMPs (*Microbial-associated molecular patterns*) ou liberam DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) quando colonizam as plantas. As plantas, por sua vez, percebem esses padrões via PRRs (*Pattern recognition receptors*) extracelulares e iniciam a PTI (PAMP-triggered immunity = **passo #1**). Os patógenos produzem fatores de virulência (efetores) que se acumulam para bloquear a percepção de PAMPs tanto no apoplasto quanto no interior das células (**passo #2**). Estes efetores são direcionados a locais subcelulares específicos onde podem suprimir PTI e facilitar a virulência (**passo #3**). Receptores intracelulares e as proteínas de resistência do tipo NLR = NBS–LRR (*Nucleotide-Binding Sites – Leucine Rich Repeats* = genes R) podem detectar os efetores nas células vegetais por meio de três mecanismos principais: **1º mecanismo** – pela interação direta dos efetores com receptores NLR (**passo #4a**); **2º mecanismo** – Os receptores NLR podem detectar indiretamente os efetores por meio de alterações mediadas pelos efetores em uma proteína denominada “decoy” que imita estruturalmente um alvo dos efetores (**passo #4b**); e **3º mecanismo “Modelo Guarda”** – as proteínas NLR podem detectar indiretamente efetores pela alteração induzidas pelos próprios efetores em um alvo de virulência do hospedeiro, tal como o domínio citosólico de um PRR – *Pattern recognition receptor* (**passo #4c**). Ainda não está claro se cada desses mecanismos de ativação atua pela mesma via molecular, nem como, ou onde, estes desencadeiam a ETI (*Effector-triggered immunity*) dependente de NLR (**passo #5**) (Adaptado de Dangl *et al.*, 2013).

Resistência recessiva – Adicionalmente às respostas de resistência relacionadas a genes R dominantes, outras estratégias evolutivas para conter a infecção de vírus envolvem fontes de

resistências de caráter recessivo que têm sido amplamente identificadas em patossistemas virais (**Kang et al., 2005**). Em vez de desencadear respostas de defesas típicas, como a reação de hipersensibilidade, a maioria das mutações recessivas leva a um ambiente celular não permissivo aos vírus devido à ausência ou mutação de fatores do hospedeiro que são necessários para estes patógenos completarem seu ciclo biológico (**Ritzenthaler, 2005; Galvez et al., 2014**). Em contraste com a resistência dominante, a resistência recessiva parece ser mais durável, uma vez que os vírus só poderiam superar a resistência do hospedeiro adaptando-se a ausência de fatores de suscetibilidade (**Ritzenthaler, 2005; Truniger & Aranda, 2009**). Uma vez que os vírus não codificam funções de tradução e dependem exclusivamente da maquinaria da célula hospedeira para sintetizar as proteínas virais, não é surpreendente que um grande número de genes de resistência recessiva tenha sido mapeado para mutações nos fatores de iniciação de tradução (eIFs) pertencente as famílias eIF4E eIF4G ou suas isoformas eIF(iso)4E e eIF(iso)4G (**Truniger & Aranda, 2009; Wang & Krishnaswamy, 2012; Julio et al., 2015**). Em geral, essas mutações impedem interações entre fatores do hospedeiro e RNA e/ou proteínas virais.

RNA interferente (RNAi) – Um dos mecanismos de defesa que é ativado imediatamente após a invasão de um vírus no tecido hospedeiro é o silenciamento de RNA, também chamado de RNA interferente (RNAi) (**Voinnet, 2009**). Este mecanismo é desencadeado por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), as quais são reconhecidas e clivadas por enzimas do tipo *Dicer-like* (DCL), dando origem a pequenos fragmentos (siRNA) que, unidos aos RISCs, mobilizam fatores para a degradação específica dos mRNAs alvo (**Sharma et al., 2013; Pumplin & Voinnet, 2013**). Como estratégia, os vírus evoluíram para a aquisição de proteínas capazes de suprimir o silenciamento de RNA e evitar a resposta de defesa da planta (**Bologna & Voinnet, 2014; Carbonell & Carrington, 2015**).

O locus *Sw-5* introgridido de *S. peruvianum* – A resistência genética é uma das várias abordagens para proteger as culturas de infecções virais. Variedades resistentes, quando disponíveis, são consideradas a forma mais rentável e confiável de controle de doenças (**Pereira-Carvalho et al., 2014**). O locus *Sw-5* identificado primeiramente na espécie de tomate selvagem *S. peruvianum* passou a ser amplamente utilizado em programas de melhoramento genético visando à obtenção variedades de tomateiro resistentes a tospovírus. A cultivar sul-africana ‘Stevens’ contendo o gene *Sw-5* que foi derivado de cruzamentos interspecíficos com acessos de *S. peruvianum* foi o primeiro material comercial de tomateiro obtido com resistência a tospovírus (**Stevens et al., 1991; Boiteux & Giordano, 1993**). O gene *Sw-5*, demonstrou ser mais estável e sem evidências de ser do tipo isolado-específico, conferindo resistência ampla a todos as principais espécies de *Tospovirus* que infectam tomateiro (**Stevens et al., 1991; Boiteux & Giordano, 1993; Roselló et al., 1998**). Em genótipos contendo o gene *Sw-5*, ocorre o desenvolvimento de lesões necróticas locais em tecidos inoculados e restrição do movimento do vírus devido a reação de hipersensibilidade (HR), característica de resistência conferida por genes dominantes (**Brommonschenkel et al., 2000**).

O locus *Sw-5* foi mapeado na região telomérica do cromossomo 9 e isolado por clonagem posicional (**Brommonschenkel et al., 2000**). Análises estruturais revelaram que o alelo resistente codifica uma proteína da classe CC-NB-LRR (**Brommonschenkel et al., 2000**). Estudos adicionais mostraram que esse gene reside dentro de um agrupamento complexo (*cluster*) formado por cinco cópias análogas (supostamente oriundas de um mesmo gene ancestral) denominadas de *Sw-5a* até *Sw-5e* (**Spasova et al., 2001**). Plantas de fumo transgênicas transformada com as cópias *Sw-5a* e *Sw-5b*, separadas ou combinadas, demonstraram o *Sw-5b* como sendo a cópia funcional e suficiente para conferir resistência contra uma ampla gama de tospovírus, incluindo as principais espécies que comumente infectam o tomateiro (TSWV,

GRSV, TCSV, CSNV) e o distantemente relacionado *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (Spasova *et al.*, 2001; Dianese *et al.*, 2011; Hallwass *et al.*, 2014). Todas essas espécies de *Tospovirus* são geográfica e filogeneticamente relacionadas e apresentam origem americana (Pappu *et al.*, 2009).

Recentemente dois trabalhos independentes demonstraram que a proteína NSm (responsável pelo transporte célula-a-célula do vírus) é o fator Avr de TSWV, sendo esse produto gênico reconhecido pelo *Sw-5* (Hallwass *et al.*, 2014; Peiró *et al.*, 2014). Em um trabalho mais recente, de Oliveira *et al.* (2016) propuseram um modelo para ativação da proteína *Sw-5b*. Nesse estudo as bases genéticas para resistência ou suscetibilidade foram investigadas com três proteínas homólogas ao *Sw-5*; a proteína funcional (*Sw-5b*); seu parálogo mais conservado a partir de *S. peruvianum* (*Sw-5a*), e o seu ortólogo mais conservado a partir de *S. lycopersicum* suscetível (*Sw-5a^S*). Análises desses homólogos revelaram características interessantes sobre o papel de cada domínio da proteína *Sw-5* e as bases genéticas da sua funcionalidade para a resistência a tospovírus. A proteína *Sw-5b* desencadeia a reação de hipersensibilidade (HR) em uma maneira dependente e independente (auto-ativação) do produto gênico viral NSm. Por sua vez, *Sw-5a* é capaz de desencadear HR apenas de maneira independente da proteína NSm de TSWV. O ortólogo *Sw-5a^S* falhou totalmente em desencadear HR em ambas as maneiras. As funções de cada domínio CC, NB-ARC e LRR foram investigadas separadamente ou em combinação (CC-NB-ARC e NB-ARC-LRR). Os resultados indicaram que o domínio NB-ARC da proteína *Sw-5b* foi suficiente para desencadear HR e o domínio LRR suficiente para reconhecer a proteína de avirulência viral (NSm). Entretanto, as duas proteínas homologas ao *Sw-5b* (*Sw-5a* e *Sw-5a^S*) parecem ser prejudicadas quanto à função de resistência devido à presença de SNPs nos domínios NB-ARCe/ou LRR. O domínio N-terminal CC foi relacionado à regulação da morte celular, pois a co-expressão desse domínio com o NB-ARC levou à supressão da morte

celular. A cópia *Sw-5a* compartilha 95.1% de identidade da sequência de aminoácidos com o seu parálogo *Sw-5b*. Embora outros parálogos do gene *Sw-5* estejam presentes na cultivar suscetível ‘Heinz 1706’ (fonte do gene *Sw-5a^S*) (Andolfo *et al.*, 2012), o *Sw-5a^S* é o homólogo mais próximo dos genes *Sw-5a* e *Sw-5b*, compartilhando 94,7% e 94,2% de identidade na sequência de aminoácidos, respectivamente (de Oliveira *et al.*, 2016).

A natureza dominante do gene *Sw-5* estimulou o seu uso em grande escala no desenvolvimento de híbridos de tomateiro. O uso de cultivares comerciais com resistência de amplo espectro contra TSWV (Stevens *et al.* 1991; Roselló *et al.* 1998), TCSV e GRSV (Boiteux & Giordano 1993) teve um impacto significativo em algumas áreas de produção de tomate, evitando reduções drásticas no rendimento dos frutos e perdas econômicas severas sob alta pressão de tripses virulíferos (Giordano *et al.*, 2000). A expressão fenotípica da resistência mediada pelo gene *Sw-5* apresenta como característica níveis variáveis de penetrância (Stevens *et al.*, 1991). Dessa forma, linhagens ou híbridos com este gene podem apresentar percentuais variáveis de plantas com sintomas ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento (de Haan *et al.*, 1996), podendo ocorrer sintomas como anéis cloróticos e necróticos nos frutos e necrose sistêmica na planta inteira após um período de inoculação (Stevens *et al.*, 1991; Boiteux & Giordano 1993; Lourenção *et al.*, 1997). Plantas de tomateiro carregando o gene *Sw-5* também podem mostrar certos níveis de instabilidade na expressão do fenótipo quando são expostas a variações extrema de temperatura durante períodos do dia (por exemplo, a alternância de noites de temperatura amena e dias quentes), uma condição ambiental comumente observada na região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Lourenção *et al.*, 1997).

Superação (“quebra”) da resistência mediada por *Sw-5* – A introdução e mais amplo emprego do gene *Sw-5* em variedades comerciais levou a uma considerável redução nas perdas

econômicas causadas por tospovírus. No entanto, o uso de materiais resistentes também serviu como uma pressão de seleção a favor de isolados virais capazes de superar esta resistência (Cho *et al.*, 1995, Latham & Jones, 1998, McMichael *et al.*, 2002, Aramburu & Marti, 2003, Ciuffo *et al.*, 2005). De fato, a presença de isolados de tospovírus capazes de quebrar a resistência é um fenômeno de certa forma esperado do ponto de vista da estrutura genômica desse grupo de vírus. Os tospovírus são mais predispostos a acumular mutações devido a sua constituição genômica *tripartite* (i.e. três segmentos de RNA). Além disso, os genomas das espécies de *Tospovirus* não dispõem de uma maquinaria de reparo (*proof-reading*) durante a replicação viral e, na ausência desse mecanismo, os índices de mutação podem ser elevados (Roossinck, 1997). Desta forma, o surgimento de novos isolados capazes de suplantarem genes de resistência estabelecidos é um fenômeno relativamente mais comum dentro deste grupo viral (Herrero *et al.*, 2000). Na Espanha, Aramburu & Marti (2003) reportaram no nordeste do país a ocorrência de um novo isolado de TSWV capaz de superar o gene *Sw-5*. O isolado espanhol (denominado GRAU) foi o primeiro reportado com a capacidade de quebrar a resistência conferida por *Sw-5* e de apresentar competência epidemiológica para se estabelecer nas áreas de cultivo. Outro isolado (conhecido como JF1) já havia sido reportado infectando plantas com o gene *Sw-5* (Thompson & Van Zijl, 1995), mas este não apresentou capacidade de disseminação para outras áreas de cultivo além do campo de origem. Ciuffo *et al.* (2005) também relataram a ocorrência de isolados com características similares na Itália. López *et al.* (2011) obtiveram evidências de que a substituição de dois aminoácidos na proteína NSm de TSWV seriam as mutações responsáveis pela superação da resistência mediada pelo gene *Sw-5b*.

A capacidade de multiplicação no inseto vetor e a composição de seu genoma tripartido podem conferir aos vírus da família *Bunyaviridae* a geração de novos isolados, a partir de eventos de recombinação de segmentos inteiros de seu genoma (Hoffmann *et al.*, 2001; Webster *et al.*,

2011b; Lian et al., 2013). Isolados recombinantes de tospovírus também foram identificados em condições naturais. **Webster et al. (2011)** detectaram e caracterizaram isolados recombinantes em plantios de tomate da Flórida, EUA. Estes isolados norte-americanos (denominados L_GM_TS_G) eram recombinantes e apresentavam os segmentos genômicos RNA S e RNA L de GRSV e RNA M de TCSV. No entanto, ainda não se sabe se esses isolados recombinantes são capazes de causar doença em plantas portadoras do gene *Sw-5*. Considerando esses mecanismos potenciais de adaptação, a manipulação de fontes alternativas de resistência para o desenvolvimento de soluções genéticas duráveis e específicas depende substancialmente de um mais refinado entendimento das interações patógeno–hospedeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. J., LEFKOWITZ, E. J., KING, A. M., HARRACH, B., HARRISON, R. L., KNOWLES, N. J., ... & NIBERT, M. **2017**. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses . Archives of Virology 1–34.
- ADKINS S, ZITTER T, MOMOL T. **2005**. Tospoviruses (Family Bunyviridae, Genus *Tospovirus*). Universidad of Florida IFAS (Institute of Food & Agricultural Science). 212 pp.
- ADHIKARI BN, SAVORY EA, VAILLANCOURT B, CHILDS KL, HAMILTON JP. **2012**. Expression profiling of *Cucumis sativus* in response to infection by *Pseudoperonospora cubensis*. PLOS One 7: e34954.
- ANDERSSON AM, MELIN L, PERSSON R, RASCHPERGER E, WIKSTROM L. PETTERSSON RF. **1997**. Processing and membrane topology of the spike proteins G1 and G2 of Uukuniemi virus. Journal of Virology 71: 218–225.
- ANDOLFO G, JUPE F, WITEK K, ETHERINGTON GJ, ERCOLANO MR, JONES JD. **2014**. Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. BMC Plant Biology 14:120.
- ARAMBURU J, MARTI M. **2003**. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. Plant Pathology 52: 407–407.
- BEZERRA I, RESENDE RO, POZZER L, NAGATA T, KORMELINK R, DE ÁVILA A. **1999**. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new *Tospovirus* species, one from chrysanthemum and one from zucchini. Phytopathology 89: 823–830.
- BLACK LL, HOBBS HA, GATTI JM. **1991**. *Tomato spotted wilt virus* resistance in *Capsicum chinense* PI 152225 and 159236. Plant Disease 75: 863.
- BOLOGNA NG AND VOINNET O. **2014**. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. Annual Review of Plant Biology 65:473–503.
- BOLLER T, FELIX, GA. **2009**. Renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annual Review of Plant Biology 60: 379–406.
- BOITEUX LS, NAGATA T. **1993**. Susceptibility of *Capsicum chinense* PI 159236 to *Tomato spotted wilt virus* isolates in Brazil. Plant Disease 77: 210.
- BOITEUX L, GIORDANO, LB. **1993**. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Euphytica 71: 151–154.

BOITEUX, LS; NAGATA T, DUTRA WP, FONSECA MEN. **1993**. Sources of resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. *Euphytica* 67: 89–94.

BOITEUX L, DE ÁVILA A. **1994**. Inheritance of a resistance specific to *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum chinense* ‘PI 159236’. *Euphytica* 75: 139–142.

BOITEUX LS, FONSECA MEN, GIORDANO LB, MELO PCT. **2012**. Melhoramento genético. In: CLEMENTE FMVT, BOITEUX LS. *Produção de tomate para processamento industrial*. Brasília DF. Embrapa pp. 31–50.

BONAS U, CONRADS-STRAUCH J, BALBO I. **1993**. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Molecular Genomics and Genetics* 238: 261–269.

BUCHER E, SIJEN T, DE HAAN P, GOLDBACH R, PRINS M. **2003**. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology* 77: 1329–1336.

BROMMONSCHENKEL SH, FRARY A, TANKSLEY SD. **2000**. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1130–1138.

BRICKELL CD, ALEXANDER C, DAVID J, HETTERSCHIED W, LESLIE A, MALECOT V, JIN X, CUBEY J. **2009**. *International code of nomenclature for cultivated plants*, International Society for Horticultural Science.

CARBONELL A, CARRINGTON JC. 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology* 27: 111–117.

CARVALHO W, FONSECA MEN, SILVA HR, BOITEUX LS, GIORDANO LB. **2005**. Estimativa indireta de teores de licopeno em frutos de genótipos de tomateiro via análise colorimétrica. *Horticultura Brasileira* 23: 819–825.

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

CHENG SS, GREEN SK, GRIGGS TD, MCLEAN BT. **1989**. The use of *Capsicum chinense* as sweet pepper cultivars and sources for gene transfer, p. 55–62. In: *Tomato and Pepper Production in the Tropics*. Proceedings of the International Symposium on Integrated Management Practices, Tainan, Taiwan, 21–26 March 1988. AVRDC Publication No. 89-317.

CHEN T, LV Y, ZHAO T, LI N, YANG Y, YU W, HE S, LIU T, ZHANG B. **2013**. Comparative transcriptome profiling of a resistant vs. susceptible tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar in response to infection by *Tomato yellow leaf curl virus*. *PLoS One* 8: e80816.

CHO JJ, CUSTER DM, BROMMONSCHENKEL SH, TANKSLEY SD. **1996**. Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to tomato spot wilt virus in vegetables. In *Tospoviruses and Thrips of Floral and Vegetable Crops*. *Acta Horticulturae* 431: 367–378.

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

CHISHOLM ST, COAKER G, DAY B, STASKAWICZ BJ. **2006**. Host–microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–814.

CIUFFO M, FINETTI-SIALER M, GALLITELLI D, TURINA M. **2005**. First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw-5* resistance gene. *Plant Pathology* 54: 564–564.

COLLIER SM, HAMEL LP, MOFFETT P. **2011**. Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NBS-LRR protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 918–931.

COOLEY MB, PATHIRANA S, WU HJ, KACHROO P, KLESSIG DF. **2000**. Members of the *Arabidopsis* HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *The Plant Cell* 12: 663–676.

COSSON P, SCHURDI-LEVRAUD V, LE QH, SICARD O, CABALLERO M, ROUX F, LE GALL O, CANDRESSE T, REVERS F. **2012**. The *RTM* resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: Natural variation of the *RTM* genes and evidence for the implication of additional genes. *PLoS One* 7: e39169.

COSTA AS, FORSTER R. **1941**. Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus de “spotted wilt.” *Bragantia* 1: 491–516.

DANGL JL, JONES JD G. **2001**. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826–833.

DANGL JL, HORVATH DM, STASKAWICZ, BJ. **2013**. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341: 746–751.

DE ÁVILA AC. **1993**. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): Organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. *Horticultura Brasileira* 11: 179–183.

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

DE BREUIL S, ABAD J, NOME C, GIOLITTI F, LAMBERTINI P, LENARDON, S. **2007**. *Groundnut ringspot virus*: an emerging *Tospovirus* inducing disease in peanut crops. *Journal of Phytopathology* 155: 251–254.

DE HAAN P, DE AVILA AC, KORMELINK R, WESTERBROEK A, GIELEN JJ, PETERS D, GOLDBACH R. **1992**. The nucleotide sequence of the S RNA of *Impatiens necrotic spot virus*, a novel tospovirus. *FEBS Letters* 306: 27–32.

DE HAAN P, ULTZEN T, PRINS M, GIELEN J, GOLBACH R, VAN GRINSVEN MAH. **1996**. Transgenic tomato hybrids resistant to *Tomato spotted wilt virus* infection. *Proceedings of the international symposium on tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops* 431: 417–426.

DELLER S, HAMMOND-KOSACK KE, RUDD JJ. **2011**. The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* 168: 63–71.

DE OLIVEIRA AS, MELO FL, INOUE-NAGATA AK, NAGATA T, KITAJIMA EW, RESENDE RO. **2012**. Characterization of Bean necrotic mosaic virus: A member of a novel evolutionary lineage within the genus *Tospovirus*. *PLoS One* 7: e38634.

DE OLIVEIRA AS, KOOLHAAS I, BOITEUX LS, CALDARARU OF, PETRESCU AJ, RESENDE RO, KORMELINK R. **2016**. Cell death triggering and effector recognition by Sw-5 SD-CNL proteins from resistant and susceptible tomato isolines to *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant Pathology* 17: 1442–1454.

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

DESLANDES L, OLIVIER J, PEETERS N, FENG DX, KHOUNLOTHAM M, BOUCHER C, SOMSSICH I, GENIN S, MARCO Y. **2003**. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 100: 8024–8029.

DIETZGEN RG, MARTIN KM, ANDERSON NG, GOODIN MM. **2012**. In planta localization and interactions of *Impatiens necrotic spot tospovirus* proteins. *Journal of General Virology* 93: 2490–2495.

DIANESE ÉC, FONSECA MEN, GOLDBACH R, KORMELINK R, INOUE-NAGATA A, RESENDE R. O, BOITEUX LS. **2010**. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Molecular Breeding* 25: 133–142.

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

DIEVART A, CLARK SE. **2004**. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131: 251–261.

DODDS PN, LAWRENCE GJ, CATANZARITI AM, TEH T, WANG CI, AYLIFFE MA, KOBE B, ELLIS JG. **2006**. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 103: 8888–8893.

DODDS PN, RATHJEN JP. **2010**. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Review Genetics* 11 539–548.

DUARTE LML, RIVAS EB, ALEXANDRE MAV, DE ÁVILA AC, NAGATA T, CHAGAS CM. **1995**. Chrysanthemum stem necrosis caused by a possible novel tospovirus. *Journal of Phytopathology* 143: 569–571.

ELBEAINO T, DIGIARO M, MARTELLI GP. **2009**. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of Virology* 154:1719–1727.

ELLIS JG, LAWRENCE GJ, LUCK JE, DODDS PN. **1999**. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. *The Plant Cell* 11: 495–506.

ERICKSON FL, HOLZBERG S, CALDERON-URREA A, HANDLEY V, AXTELL M. **1999**. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defense response in tobacco. *The Plant Journal* 18: 67–75.

EULGEM T, SOMSSICH IE. **2009**. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 366–371.

FAUQUET CM, MAYO M, MANILOFF J, DESSELBERGER U, BALL LA. **2005**. *Virus taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Access Online via Elsevier.

FENG Z, CHEN X, BAO Y, DONG J, ZHANG Z, TAO X. **2013**. Nucleocapsid of Tomato spotted wilt tospovirus forms mobile particles that traffic on an actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. *New Phytologist* 200: 1212–1224.

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

FILGUEIRA FAR. **2003**. Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa, MG: UFV. 402 pp.

FONTES EPB, SANTOS AA, LUZ DF, WACLAWOVSKY AJ, CHORY J. **2004**. The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. *Genes and Development* 18: 2545–2556.

- GAMAGE SMW, MCGRATH DJ, PERSLEY DM, DIETZGEN RG. **2016**. Transcriptome analysis of *Capsicum chlorosis virus*-induced hypersensitive resistance response in bell *Capsicum*. PLoS One 11: e0159085.
- GALVEZ LC, BANERJEE J, PINAR H AND MITRA A. **2014**. Engineered plant virus resistance. Plant Science 228:11–25.
- GARRIDO-RAMIREZ R, DUDARSHANA MR, LUCAS WJ, GILBERTSON RL. **1998**. *Bean dwarf mosaic virus* BV1 protein is a determinant of the hypersensitive response and avirulence in *Phaseolus vulgaris*. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 1184 – 1194.
- GEBHARDT C1, VALKONEN JP. **2001**. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. Annual Review of Phytopathology 39: 79–102.
- GIORDANO LB, DE ÁVILA AC, CHARCHAR JM, FERRAZ, E, BOITEUX LS. **2000**. ‘Viradoro’: A tospovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. HortScience 35: 1368–1370.
- GŁOWACKI S, MACIOSZEK VK, KONONOWICZ AK. **2011**. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. Cell Molecular Biology Letters 16: 1–24.
- GOLDBACH R, PETERS D. **1994**. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. p. 113–120, In: Seminars in Virology. Academic Press, New York.
- GOYER A, HAMLIN L, CROSSLIN JM, BUCHANAN A, CHANG JH. **2015**. RNA-Seq analysis of resistant and susceptible potato varieties during the early stages of potato virus Y infection. BMC Genomics 16: 472.
- GRUBE RC, RADWANSKI ER, JAHN M. **2000**. Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. Genetics 155: 873–887.
- HAGEN C, FRIZZI A, KAO J, JIA L, HUANG M, ZHANG Y, HUANG S. **2011**. Using small RNA sequences to diagnose, sequence, and investigate the infectivity characteristics of vegetable-infecting viruses. Archives of Virology 156: 1209–1216.
- HANTON SL, MATHESON LA, BRANDIZZI F. **2006**. Seeking a way out: Export of proteins from the plant endoplasmic reticulum. Trends in Plant Sciences 11: 335–343.
- HARVEY M, QUILLEY S, BEYNON H. **2002**. Exploring the tomato: Transformations of nature, society and economy. Cheltenham, UK: Edward Elgar.
- HALLWASS M, DIANESE EC, DICK LOHUIS, BOITEUX LS, NAGATA AKI, RESENDE RO, KORMELINK R. **2014**. The *Tomato spotted wilt virus* cell-to-cell movement protein (NS_M) triggers a hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional *Sw-5b* resistance gene copy. Molecular Plant Pathology 15: 871–880.
- HE P, SHAN L, SHEEN J. **2007**. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern triggered immunity in plant-microbe interactions. Cell Microbiology 9: 1385–1396.

HERRERO S, CULBREATH AK, CSINOS AS, PAPPU HR, RUFTY RC, DAUB ME. **2000**. Nucleocapsid gene-mediated transgenic resistance provides protection against *Tomato spotted wilt virus* epidemics in the field. *Phytopathology* 90: 139–147.

HOFFMANN K, QIU W, MOYER J. **2001**. Overcoming host- and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 242–249.

HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, ZUMLA A. **2005**. Real-time RT-PCR normalisation; Strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279–284.

HULL R. **2002**. *Matthews' Plant Virology*. San Diego, CA: Academic. 1001 pp.

IE TS. **1971**. Electron microscopy of developmental stages of *Tomato spotted wilt virus* in plant cells. *Virology* 2: 468–479.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático de Produção Agrícola - LSPA, **2017**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201612.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201612.pdf)> Acesso em: 27 Janeiro 2017.

ISHIBASHI K, MAWATARI N, MIYASHITA S, KISHINO H, MESHI T, ISHIKAWA M. **2012**. Coevolution and hierarchical interactions of *Tomato mosaic virus* and the resistance gene *Tm-1*. *PLoS Pathogens* 8: e1002975.

JONES J D, DANGL JL. **2006**. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.

JIANG L, HUANG Y, SUN L, WANG B, ZHU M, LI J, DONG J. **2016**. Occurrence and diversity of *Tomato spotted wilt virus* isolates breaking the *Tsw* resistance gene of *Capsicum chinense* in Yunnan, Southwest China. *Plant Pathology* (on line).

JIAY, MCADAMS SA, BRYAN GT, HERSHEY HP, VALENT B. **2000**. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal* 19: 4004–4014.

JULIO E, COTUCHEAU J, DECORPS C, VOLPATTI R, SENTENAC C, CANDRESSE T AND DORLHAC DE BORNE F. **2015**. A eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the “va” tobacco recessive resistance to potyviruses. *Plant Molecular Biology Reporter* 33: 609–623.

JUNGLEN S. **2016**. Evolutionary origin of pathogenic arthropod-borne viruses – A case study in the family Bunyaviridae. *Archives of Virology* 154:1719–1727.

KANG BC, Yeam I and Jahn MM. **2005**. Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology* 43: 581–621.

KEEN NT. **1990**. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* 24: 447–473.

KIM HS, DESVEAUX D, SINGER AU, PATEL P, SONDEK J, DANGL JL. **2005**. The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 102: 6496–6501.

KIKKERT M, VAN LENT J, STORMS M, BODEGOM P, KORMELINK R, GOLDBACH R. **1999**. *Tomato spotted wilt virus* particle morphogenesis in plant cells. Journal of Virology 73: 2288–2297.

KITAJIMA EW. **1965**. Electron microscopy of vira-cabeça virus (Brazilian *Tomato spotted wilt virus*) within the host cell. Virology 26: 89–99.

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

KOMODA K, ISHIBASHI K, KAWAMURA-NAGAYA K, ISHIKAWA M. **2014**. Possible involvement of eEF1A in *Tomato spotted wilt virus* RNA synthesis. Virology 468: 81–88.

KORMELINK R, DE HAAN P, MEURS C, PETERS D, GOLDBACH R. **1992**. The nucleotide sequence of the M RNA segment of *Tomato spotted wilt virus*, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. The Journal of General Virology 73: 2795–2804.

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

LANFERMEIJER FC, DIJKHUIS J, STURRE MJG, DE HAAN P, HILLE J. **2003**. Cloning and characterization of the durable *tomato mosaic virus* resistance gene *Tm-22* from *Lycopersicon esculentum*. Plant Molecular Biology 52: 1039–1051.

LATHAM LJ, JONES RAC. **1998**. Selection of resistance breaking strains of *Tomato spotted wilt tospovirus* strains. Annals of Applied Biology 133: 385–402.

LAW M, MOYER J. **1990**. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. Journal of General Virology 71: 933–938.

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

LI CX, SHI M, TIAN JH, LIN XD, KANG YJ, CHEN LJ, QIN XC, XU J, HOLMES EC, ZHANG YZ. **2015**. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. Elife 4:e05378.

LIAN S, LEE JS, CHO WK, YU J, KIM MK, CHOI HS, KIM KH. **2013**. Phylogenetic and recombination analysis of *tomato spotted wilt virus*. PloS One 8: e63380.

LIMA MF, BARRIOLLI CC, FONTES MG, BOITEUX LS, ALMEIDA JM. **2015**. A five-year survey of tospoviruses infecting vegetable crops in the main producing regions of Brazil. p.117. In: *Book of Abstracts of the Xth International Symposium on Thysanoptera & Tospoviruses*, Asilomar, Pacific Grove, California, USA.

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

LOURENÇÃO AL, NAGAI H, SIQUEIRA WJ, USBERTI FILHO JA, MELO A. **1997**. Seleção de tomateiros resistentes a tospovírus. *Bragantia* 56: 21–31.

LÓPEZ C, ARAMBURU J, GALIPIENSO L, SOLER S, NUEZ F, RUBIO L. **2011**. Evolutionary analysis of tomato *Sw-5* resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology* 92: 210–215.

LOVATO FA, INOU-NAGATA AK, NAGATA T, DE ÁVILA AC, PEREIRA LAR, RESENDE RO. **2008**. The N protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in *Capsicum chinense* plants, a hypersensitive host to TSWV infection. *Virus Research* 137: 245–252.

LUCK JE, LAWRENCE GJ, DODDS PN, SHEPHERDKW, ELLIS JG. **2000**. Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. *Plant Cell* 12: 1367–1377.

MACKEY D, HOLT BF, WIIG A, DANGL JL. **2002**. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743–754.

MARTINEZ DE ILARDUYA O, NOMBELA G, HWANG CF, WILLIAMSON VM, MUNIZ M, KALOSHIAN I. **2004**. Rme1 is necessary for *Mi-1*-mediated resistance and acts early in the resistance pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 55–61.

MATSUOKA Y, CHEN SY, HOLLAND CE, COMPANS RW. **1996**. Molecular determinants of Golgi retention in the Punta Toro G1 glycoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 336: 184–189.

MCMICHAEL LA, PERSLEY DM, THOMAS JE. **2002**. A new tospovirus serogroup IV species infecting *Capsicum* and tomato in Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathology* 313: 231–239.

MEYERS BC, CHIN DB, SHEN KA, SIVARAMAKRISHNAN S, LAVELLE DO. **1998**. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *The Plant Cell* 10: 1817–1832.

MEYERS BC, DICKERMAN AW, MICHELMORE RW, SIVARAMAKRISHNAN S, SOBRAL BW, YOUNG ND. **1999**. Plant disease resistance genes encode members of an ancient

and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* 20: 317–332.

MILNE RG. **1970**. An electron microscope study of *Tomato spotted wilt virus* in sections of infected cells and in negative stain preparations. *Journal of General Virology* 6: 267–276.

MONDRAGON-PALOMINO M, MEYERS BC, MICHELMORE RW, GAUT BS. **2002**. Patterns of positive selection in the complete NBS-LRR gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research* 12:1305–1315.

MOUND LA. **1996**. The Thysanoptera vector species of Tospoviruses. *Acta Hort.*, 431: 298-307.

MUCYN TS, CLEMENTE A, ANDRIOTIS VME, BALMUTH AL, OLDROYD GED. **2006**. The tomato NBARC-LRR protein *Prf* interacts with *Pto* kinase *in vivo* to regulate specific plant immunity. *The Plant Cell* 18: 2792–2806.

NACHAPPA P, MARGOLIES DC, NECHOLS JR, WHITFIELD AE, ROTENBERG D **2013**. *Tomato spotted wilt virus* benefits a non-vector arthropod, *Tetranychus urticae*, by modulating different plant responses in tomato. *PLoS One* 8: e75909.

NAGATA T, RESENDE RO, KITAJIMA EW, COSTA H, INOUE-NAGATA AK, ÁVILA AC. **1998**. First report of natural occurrence of *Zucchini lethal chlorosis* tospovirus on cucumber and *Chrysanthemum stem necrosis* tospovirus on tomato in Brazil. *Plant Disease* 82: 1403.

NAGATA T, DE ÁVILA AC, TAVARES PCT, BARBOSA CJ, JULIATTI FC, KITAJIMA EW. **1995**. Occurrence of different tospoviruses in six states of Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 20: 90–95.

NAGATA T, MOUND LA, FRANÇA FH, DE ÁVILA AC. **1999**. Identification and rearing of four thrips species vectors of *Tospovirus* in the Federal District, Brazil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28: 535–539.

NAGATA T, ALMEIDA A, RESENDE RO, DE ÁVILA AC. **2004**. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology* 53: 136–140.

NOEL L, MOORES TL, VAN DER BIEZEN EA, PARNISKE M, DANIELS MJ. **1999**. Pronounced intraspecific haplotype divergence at the *RPP5* complex disease resistance locus of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11: 2099–2112.

NOMBELA G, WILLIAMSON VM, MUNIZ M. **2003**. The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 645–649.

NURNBERGER T, BRUNNER F, KEMMERLING B, PIATER L. **2004**. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunology Review* 198: 249–266.

PANDEY SP, SOMSSICH IE. **2009**. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology* 150: 1648–1655.

PAPPU HR, JONES RAC, JAIN RK. **2009**. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 2219–2236.

PEREIRA-CARVALHO RC, LORENA M, DIANESE EC, FONSECA MEN, BOITEUX LS. **2014**. Melhoramento genético do tomateiro para resistência a doenças de etiologia viral. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 22: 280–361.

PEIRÓ A, CAÑIZARES MC, RUBIO L, LÓPEZ C, MORIONES E, ARAMBURU J, SÁNCHEZ-NAVARRO J. **2014**. The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. *Molecular Plant Pathology* 8: 802–813.

PERALTA IE, KNAPP S, SPOONER DM. **2006**. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report* 56: 6–12.

PIETERSEN G, MORRIS J. **2002**. Natural occurrence of *Groundnut ringspot virus* on soybean in South Africa. *Plant Disease* 86: 1271.

PLYUSNIN A, BEATY B, ELLIOTT RM, GOLDBACH R, KORMELINK R, LUNDKVIST Å, SCHMALJOHN CS, TESH RB. **2012**. *Bunyaviridae*. Elsevier Academic Press, London, UK.

PRINS M, GOLDBACH R. **1998**. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in Microbiology* 6: 31–35.

POZZER L, BEZERRA IC, KORMELINK R, PRINS M, PETERS D, RESENDE RO, DE ÁVILA AC. **1999**. Characterization of a tospovirus isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Disease* 83: 345–350.

RAIRDAN GJ, MOFFETT P. **2006**. Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein *Rx* mediate LRR binding and inhibition of activation. *Plant Cell* 18: 2082–2093.

REIS A, LOPES CA. **2012**. Doenças causadas por fungos e distúrbios fisiológicos. In: CLEMENTE FMVT, BOITEUX LS. *Produção de tomate para processamento industrial*. Brasília DF. Embrapa p. 179–202.

RESENDE RDO, POZZER L, NAGATA T, BEZERRA I, LIMA M, DE BRITO GIORDANO L, KITAJIMA E, DE ÁVILA A. **1996**. New tospoviruses found in Brazil. *Acta Horticulturae* 431: 78–89.

RESENDE LV; BARRETTI PB; MEDEIROS FCL; SILVA DD; PEREIRA RB; LINS SRO; PEREIRA LM; CAMPOS MA. **2007**. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 15: 129–198.

- RIBEIRO, D., FORESTI O, DENECKE J, WELLINK J, GOLDBACH R KORMELINK RJ. **2008**. *Tomato spotted wilt virus* glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. *Journal of General Virology* 89: 1811–1818.
- RIBEIRO D, GOLDBACH R, KORMELINK R. **2009**. Requirements for ER-arrest and sequential exit to the Golgi of *Tomato spotted wilt virus* glycoproteins. *Traffic* 10: 664–672.
- RITZENTHALER C. **2005**. Resistance to plant viruses: Old issue, news answers? *Current Opinion in Biotechnology* 16:118–122.
- RONNHOLM, R. **1992**. Localization to the Golgi complex of Uukuniemi virus glycoproteins G1 and G2 expressed from clones cDNAs. *Journal of Virology* 66: 4525–4531.
- ROOSSINCK MJ. **1997**. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35: 191–209.
- ROSELLÓ S, DÍEZ MJ, NUEZ F. **1996**. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The *Tomato spotted wilt virus*—a review. *Scientia Horticulturae* 67: 117–150.
- ROSELLÓ S, DÍEZ MJ, NUEZ F. **1998**. Genetics of *Tomato spotted wilt virus* resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 499–509.
- ROTENBERG D, JACOBSON AL, SCHNEWEIS DJ, WHITFIELD AE. **2015**. Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinions in Virology* 15:80–89.
- SAMUEL G, BALD J, PITTMAN H. **1930**. Investigations on ‘spotted wilt’ of tomatoes. *Bulletin Australian Council for Scientific and Industrial Research* 44, 64 pp.
- SCHNETTLER E, HEMMES H, HUISMANN R, GOLDBACH R, PRINS M, KORMELINK R. **2010**. Diverging affinity of *Tospovirus* RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *Journal of Virology* 84: 11542–11554.
- SCHOLTHOF, KBG, ADKINS S, CZOSNEK H, PALUKAITIS P, JACQUOT E, HOHN T, SAUNDERS K, CANDRESSE T, AHLQUIST P, HEMENWAY C, FOSTER GD. **2011**. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938–954.
- SHIU SH, BLEECKER AB. **2001**. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 98: 10763–10768.
- SILVA MS, MARTINS CR, BEZERRA IC, NAGATA T, DE AVILA AC, RESENDE RO. **2001**. Sequence diversity of NS(M) movement protein of tospoviruses. *Archives of Virology* 146: 1267–1281.
- SINGH P, INDI SS, SAVITHRI HS. **2014**. *Groundnut bud necrosis virus* encoded NSm associates with membranes via its C-terminal domain. *PloS One* 9: e99370.

SIN SH, MCNULTY BC, KENNEDY GG, MOYER JW. **2005**. Viral genetic determinants for thrips transmission of *Tomato spotted wilt virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 102: 5168–5273.

SNIPPE M, WILLEM BORST J, GOLDBACH R, KORMELINK R. **2007**. *Tomato spotted wilt virus* Gc and N proteins interact *in vivo*. Virology 357: 115–123.

SPASSOVA MI, PRINS TW, FOLKERTSMA RT, KLEIN-LANKHORST RM, HILLE J, GOLDBACH RW, PRINS M. **2001**. The tomato gene *Sw-5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. Molecular Breeding 7: 151–161.

SPOONER DM, PERALTA IE, KNAPP S. **2005**. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. Taxon 54: 43–61.

STEVENS M, SCOTT S, GERGERICH R. **1991**. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. Euphytica 59: 9–17.

STORMS M, KORMELINK R, PETERS D, VAN LENT J, GOLDBACH R. **1995**. The nonstructural NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. Virology 214: 485–493.

TAKKEN FL, GOVERSE A. **2012**. How to build a pathogen detector: Structural basis of NB-LRR function. Current Opinion in Plant Biology 15: 375–384.

TAKEDA A, SUGIYAMA K, NAGANO H, MORI M, KAIDO M, MISE K, TSUDA S, OKUNO T. **2002**. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. FEBS Letters 532: 75–79.

TAKKEN FLW, ALBRECHT M, TAMELING WIL. **2006**. Resistance proteins: molecular switches of plant defense. Current Opinion in Plant Biology 9: 383–390.

THOMPSON G, VAN ZIJL J. **1995**. Control of *Tomato spotted wilt virus* in tomatoes in South Africa. Acta Horticulturae 431: 379–384.

TOKARZ R, WILLIAMS SH, SAMEROFF S, SANCHEZ LEON M, JAIN K, LIPKIN WI. **2014**. Virome analysis of *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis* ticks reveals novel highly divergent vertebrate and invertebrate viruses. Journal of Virology 88:11480–11492.

TRUNIGER V AND ARANDA MA. **2009**. Recessive resistance to plant viruses. Advances in Virus Research 75:119–159.

TURINA M, KORMELINK R, RESENDE RO. **2016**. Resistance to tospoviruses in vegetable crops: Epidemiological and molecular aspects. Annual Review of Phytopathology 54: 15.1–15.25.

UEDA H, YAMAGUCHI Y0, SANO H. **2006**. Direct interaction between the *Tobacco mosaic virus* helicase domain and the ATP bound resistance protein, N factor, during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 61: 31–45.

ULLMAN DE, WHITFIELD AE, GERMAN TL. **2005**. Thrips and tospoviruses come of age: Mapping determinants of insect transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 102: 4931–4932.

VAN DER BIEZEN EA, JONES JDG. **1998a**. The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology* 8: 226–227.

VAN DER BIEZEN EA, JONES JDG. **1998b** Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Plant Sciences* 23: 454–456.

VAN DER HOORN RAL, ROTH R, DEWIT PJGM. **2001**. Identification of distinct specificity determinants in resistance protein *Cf-4* allows construction of a *Cf-9* mutant that confers recognition of avirulence protein AVR4. *The Plant Cell* 13: 273–285.

VAN DER HOORN RAL, KAMOUN S. **2008**. From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* 20: 2009–2017.

VAN KNIPPENBERG I, LAMINE M, GOLDBACH R, KORMELINK R. **2005**. Tomato spotted wilt virus transcriptase in vitro displays a preference for cap donors with multiple base complementarity to the viral template. *Virology* 335:122–130.

VAN OIJEN G, VAN DEN BURG H, CORNELISSEN BJC, TAKKEN FLW. **2007**. A Structure and Function of Resistance Proteins in Solanaceous Plants. *Annual Review of Phytopathology* 45:43–72.

VAN POELWUK F, BOYE K, OOSTERLING R, PETERS D, GOLDBACH R. **1993**. Detection of the L protein of *tomato spotted wilt virus*. *Virology* 197: 468–470.

VAN POELWIJK F, PRINS M, GOLDBACH R. **1997**. Completion of the impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family Bunyaviridae. *Journal of General Virology* 78: 543–546.

VAN DE WETERING F, GOLDBACH R, PETERS D. **1996**. Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology* 86: 900–905.

VAN VERK MC, HICKMAN R, PIETERSE CM, VAN WEES SC. **2013**. RNASeq: Revelation of the messengers. *Trends Plant Sciences* 18: 175–179.

VERLAAN MG, HUTTON SF, IBRAHEM RM, KORMELINK R, VISSER RG, SCOTT JW, EDWARDS JD, BAI Y. **2013**. The *Tomato yellow leaf curl virus* resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-Class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genetics* 9: e1003399.

VOS P, SIMONS G, JESSE T, WIJBRANDI J, HEINEN L. **1998**. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology* 16:1365–1369.

WEBER H, SCHULTZE S, PFITZNER AJP. **1993**. Two amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-22 resistance gene in the tomato. *Journal of Virology* 67: 6432–6438.

WEBSTER CG, REITZ SR, PERRY KL, ADKINS S. **2011**. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant-and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology* 413: 216–225.

WHITHAM S, DINESH-KUMAR SP, CHOI D, HEHL R, CORR C, BAKER B. **1994**. The product of the *Tobacco mosaic virus* resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101–1115.

WHITFIELD A E, ULLMAN DE, GERMAN TL. **2005**. Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43: 459–489.

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

WULFF BBH, THOMAS CM, SMOKER M, GRANT M, JONES JDG. **2001**. Domain swapping and gene shuffling identify sequences required for induction of an Avr-dependent hypersensitive response by the tomato *Cf-4* and *Cf-9* proteins. *The Plant Cell* 13: 255–272.

YAMAJI Y, MAEJIMA K, KOMATSU K, SHIRAISHI T, OKANO Y, HIMENO M, SUGAWARA K, NERIYA Y, MINATO N, MIURA C, HASHIMOTO M, NAMBA S. **2012**. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *The Plant Cell* 24: 778–793.

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

JUSTIFICATIVA

Os tospovírus estão entre os agentes virais de maior importância para a agricultura mundial, provocando perdas consideráveis em várias culturas e, sobretudo, em hortaliças. Levantamentos recentes têm apontado que a espécie GRSV está se tornando predominante em áreas de cultivos com tomateiro, com outras hortaliças e também em plantas nativas e invasoras no Brasil.

O emprego de variedades de polinização aberta e de híbridos resistentes representa a principal estratégia de controle de doenças virais em plantas. Dessa forma, programas de melhoramento visando resistência a tospovírus têm se baseado na busca por fontes adicionais de resistência principalmente em germoplasma de espécies selvagens.

O gene *Sw-5* é a principal fonte de resistência a tospovírus em tomateiro, entretanto, isolados capazes de superar a resistência mediada por esse fator genético já foram relatados em alguns países. Dessa forma torna-se necessária a busca por novas fontes de resistência em tomateiro. Considerando a relativa escassez de trabalhos sobre a caracterização da expressão fenotípica da resistência detectada na cultivar ‘Rey de los Tempranos’ (= ‘PI 203230’), foi conduzido um estudo de estabilidade da resistência frente à inoculação com distintas espécies/isolados de tospovírus.

O estudo do transcrito na interação compatível tomateiro – GRSV pode fornecer informações cruciais sobre os mecanismos de patogênese e sobre o subconjunto de genes da planta hospedeira que seriam inibidos ou induzidos pela infecção por GRSV. O estudo da infecção sistêmica neste tipo de interação permite inferir quais funções biológicas foram afetadas pelos vírus.

Os conhecimentos gerados nestes estudos proporcionarão importantes alternativas com potencial aplicação na biotecnologia, tais como o silenciamento de genes cruciais para a patogênese viral visando o desenvolvimento de potenciais sistemas de transformação e obtenção de plantas com distintos fatores de resistência a esse grupo de patógenos.

OBJETIVOS

1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve os seguintes objetivos gerais: **(1)** estudar a interação do tomateiro com tospovírus através da análise transcritômica na interação compatível *Solanum lycopersicum*-*Groundnut ringspot virus* (GRSV); **(2)** avaliar a resistência a tospovírus na cv. ‘Rey de Los tempranos’ e **(3)** caracterizar novas espécies de plantas hospedeiras de GRSV.

2. Objetivos Específicos

- Estudar (no nível de expressão gênica) os mecanismos associados com a patogênese de GRSV em tomateiro;
- Identificar e catalogar o repertório de genes inibidos ou induzidos pela infecção por GRSV em um acesso de tomateiro altamente suscetível (cv. ‘Santa Clara’);
- Avaliar a amplitude da resistência da cv. ‘Rey de Los Tempranos’;
- Caracterizar isolados de tospovírus associados com novas hospedeiras nas condições brasileiras;

CAPÍTULO II

Transcritoma da interação compatível *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’– *Groundnut ringspot virus* revela um amplo reportório de genes modulados pela infecção viral em uma hospedeira altamente suscetível.

RESUMO

Groundnut ringspot virus (GRSV), pertencente ao gênero *Tospovirus*, é um dos patógenos mais importantes para a cultura do tomateiro, principalmente em condições brasileiras, comprometendo a produtividade e qualidade dos frutos. Embora causando doenças economicamente importantes, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de patogênese desse vírus. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar os genes hospedeiros diferencialmente expressos (DEGs) na interação compatível entre *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’–GRSV usando a tecnologia de RNAseq. Amostras foliares de plantas de ‘Santa Clara’ (mecanicamente inoculadas com o vírus e *mock*-inoculadas) foram coletadas a 0, 3, 5, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI). Um ‘pool’ equimolar foi estabelecido entre os períodos 3-5 (3-5DAI) e 7-10 (7-10DAI) após a extração, análise da concentração e qualidade do RNA. Um total de 12 bibliotecas de cDNA foram preparadas a partir das amostras de RNA e sequenciadas usando a tecnologia Illumina (HiSeq 2500). Um total de 396.2 milhões de *reads* foram mapeados no genoma do tomateiro com o uso do software SeqMan NGene e a expressão gênica foi analisada com o software ArrayStar. Cerca de 9.206 genes foram diferencialmente expressos na interação *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’ – GRSV com relação ao controle *mock* inoculado (*fold change* ≥ 2 e *p value* $\leq 0,05$). Dentre esses genes 5.562, 5.283 e 3.924 foram identificados nos períodos 0DAI, 3-5DAI e 7-10DAI, respectivamente. A classificação funcional dos DEGs foi feita por

meio do Gene Ontology (GO) usando o software blast2GO PRO. Os DEGs foram agrupados nas categorias de ‘processos biológicos’, ‘funções moleculares’ e ‘componentes celulares’. Foi dada ênfase aos DEGs envolvidos em processos fotossintéticos (cloroplastos, tilacóides e fotossistemas), genes associados com retículo endoplasmático e complexo de Golgi, plasmodesmas, detoxificação celular, fatores de transdução de sinais e genes envolvidos em sinalização celular. A presente análise permitiu elucidar alguns dos mecanismos moleculares associados com a patogênese de GRSV em tomateiro bem como identificar genes inibidos e induzidos pela infecção viral que podem ser alvos de potencial manipulação genética visando à obtenção de variedades resistentes.

Palavras chaves: patogênese, tospovírus, tomateiro, expressão gênica.

ABSTRACT

Groundnut ringspot virus (GRSV), genus *Tospovirus*, is one of the most important tomato crop pathogens under Brazilian conditions, causing significant yield and fruit quality losses. Even though inducing economically important diseases, little is known about the mechanisms of pathogenesis of this virus. In this context, this work aimed to analyze the differentially expressed genes (DEGs) in the compatible interaction between *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’ – GRSV using RNAseq technology. Leaf samples from cv. ‘Santa Clara’ (mechanically inoculated with GRSV and mock-inoculated) were collected at 0, 3, 5, 7, and 10 days after inoculation (DAI). An equimolar pool encompassing the periods 3-5 (3-5 DAI) and 7-10 (7-10 DAI) was established after extraction, concentration, and quality analyses of the total RNA. A total of 12 cDNA libraries were prepared from the RNA samples and sequenced using Illumina technology (HiSeq 2500). A total of 396 million reads were mapped into the tomato genome using the SeqMan

NGene software and gene expression was analyzed with the ArrayStar software. Approximately 9,206 differentially expressed genes (DEGs) were found in the interaction *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’ – GRSV when compared with the inoculated mock control (fold change ≥ 2 and p value ≤ 0.05). Among these genes 5,562; 5,283 and 3,924 genes were identified in the 0DAI, 3-5DAI and 7-10DAI periods, respectively. Functional classification of DEGs was done through Gene Ontology (GO) using the blast2GO PRO software. The DEGs were grouped into the three major categories: ‘biological processes’, ‘molecular functions’ and ‘cellular components’. Emphasis was given in the analysis of DEGs involved in photosynthetic processes (such as chloroplasts, thylakoids and photosystems) as well as genes associated with endoplasmic reticulum and Golgi complex, plasmodesmata, cellular detoxification, signal transduction factors, as well as genes involved in cell signaling. The present analysis allowed the elucidation of some of the molecular mechanisms associated with the pathogenesis of GRSV in tomato plants as well as the identification of genes inhibited and induced by viral infection, which may be potential targets for genetic manipulation in order to obtain resistant varieties.

Keywords: pathogenesis, tospovirus, tomato, gene expression.

INTRODUÇÃO

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que possuem genomas compactos e que codificam um reduzido repertório de produtos gênicos (estruturais ou constitutivos) para completarem, de maneira efetiva, o processo de infecção de uma planta hospedeira (**Van Schie & Takken, 2014**). Neste sentido, os vírus são absolutamente dependentes da maquinaria da célula hospedeira, necessitando recrutar e modular fatores da planta para os processos cruciais de replicação, tradução, movimento célula-a-célula, movimento sistêmico e encapsidação (**Boualem**

et al., 2016). Por sua vez, quando infectadas, as plantas respondem com um elaborado sistema de defesa contra os vírus invasores (Boualem *et al.*, 2016).

Os diferentes gêneros de fitovírus requerem e mobilizam distintos repertórios de proteínas hospedeiras. Estudos conduzidos com uma ampla gama de interações vírus-plantas ilustram como estes patógenos se apropriam dos componentes da célula vegetal para desativar os mecanismos de defesa e promover sua própria replicação (Wittmann *et al.*, 1997; Yamanaka *et al.*, 2002; Wang & Krishnaswamy, 2012; Van Schie & Takken, 2014; Boualem *et al.*, 2016; Nagy, 2016). Como resultado dessas interações, as plantas suscetíveis exibem uma série de alterações fisiológicas, incluindo redução na atividade fotossintética, aumento da respiração, acumulação de compostos nitrogenados, compartimentalização subcelular e ampliação de atividades oxidativas (Culver & Padmanabhan, 2007; Nagy, 2016). Combinados, esses efeitos fisiológicos consituem a base para a expressão dos sintomas típicos que são induzidos pelos diferentes grupos e espécies de vírus.

As espécies do gênero *Tospovirus* (recentemente reclassificado para o gênero *Orthotospovirus*, família *Tospoviridae*, ordem *Bunyavirales*) estão entre os patógenos de maior importância para a agricultura mundial (ICTV, 2017), provocando perdas em várias culturas, incluindo o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Scholthof *et al.*, 2011). Os tospovírus são transmitidos por tripes (Ordem: Thysanoptera; família: Thripidae). A relação de transmissão é caracterizada como sendo do tipo circulativa-propagativa (Wijkamp *et al.*, 1995). Os tospovírus possuem partículas esféricas envolvidas por uma membrana lipídica, denominada envelope. O genoma dos tospovirus consiste de três segmentos de RNA denominados de RNA L = *large* (~8.9 kb), RNA M = *medium* (~4.8 kb) e RNA S = *small* (~2.9 kb) e apresenta uma combinação de polaridades negativa e ambisenso. O RNA L é de polaridade negativa e contém o gene codificador da proteína estrutural **RdRp** (RNA polimerase dependente de RNA). O RNA M é

ambisenso e codifica (na orientação senso positivo) a proteína não estrutural **NSm** (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) e, no sentido negativo, codifica os precursores das glicoproteínas (**Gn & Gc**). O RNA S é ambisenso e contém os genes codificadores das proteínas **NSs** (supressora do silenciamento gênico) e **N** (nucleocapsídeo) (**Takeda et al., 2002, Bucher et al., 2003, Snippe et al., 2007**).

Após ingressar nas células hospedeiras, as partículas de tospovírus perdem o envelope lipídico (possivelmente pela ação de enzimas hospedeiras) desagregando assim o **complexo de ribonucleoproteínas (RNPs)** que é composto pelo RNA viral e as proteínas N e RdRp (**Kormelink et al., 2011**). A polimerase viral então transcreve os RNAs genômicos, sintetizando os RNAs mensageiros (mRNA). Análises ultraestruturais do processo infeccioso e dos distúrbios intracelulares induzidos pela infecção por tospovírus mostram partículas virais dentro do **retículo endoplasmático (ER)** e/ou associadas com as membranas do envelope nuclear (**Kitajima, 1965**). Posteriormente foi demonstrado que estruturas membranosas derivadas do **complexo de Golgi** estariam associadas com a formação das partículas virais de TSWV (**Kitajima et al., 1992; Kikkert et al., 1999**). Antes de serem envelopadas, as glicoproteínas Gn e Gc acumulam-se no complexo de Golgi e induzem à formação de estruturas membranosas derivadas da modificação do ER e do complexo de Golgi. **Kikkert et al. (1999)** demonstraram que **membranas paralelas pareadas (PPM)** derivadas do complexo de Golgi são os prováveis sítios da morfogênese das partículas virais duplamente envelopadas (**DEVs – double-enveloped virus particles**). Em um estágio final de maturação, o complexo de ribonucleoproteínas presentes no citoplasma é envolvido por essas **PPMs** para dar origem a **DEVs**. Em seguida ocorre a fusão entre diferentes **DEVs** bem como a fusão das **DEVs** com membranas do ER, dando origem a partículas virais maduras contendo um único envelope (**SEVs – single-enveloped virus particles**), resultando na

formação de grandes vesículas dentro do citoplasma hospedeiro. ([Kitajima et al., 1992](#); [Kikkert et al., 1999](#); [2001](#)).

A proteína NSs interfere no processo infeccioso através da supressão do silenciamento induzido pela hospedeira em distintas etapas ([Takeda et al., 2002](#)). [Schnettler et al. \(2010\)](#) demonstraram que a proteína NSs de TSWV e GRSV liga-se a longos RNAs dupla-fita (dsRNAs) e impede a clivagem dessas moléculas pelas enzimas ‘dicer’. A proteína NSs também se liga a dsRNAs curtos e impede a ativação do **RISC (RNA-induced silencing complex)** pelo sequestro de siRNA. A função enzimática do tipo NTPase/dATPase e 5’ α -fosfatase da proteína NSs foi demonstrada com um isolado de *Groundnut bud necrosis virus* – GBNV. O complexo RISC é incapaz de reconhecer e carregar fragmentos de RNA que não tenham a extremidade 5’ fosforilada ([Lokesh et al., 2010](#)).

As observações prévias de que a proteína NSm se associa com as membranas do ER ([Dietzgen et al., 2012](#); [Leastro et al., 2015](#)) foram recentemente confirmadas por [Feng et al. \(2016\)](#) que observaram que a proteína NSm interage fisicamente (de modo intercelular) por meio dos plasmodesmas com a membrana do ER na hospedeira *Nicotiana benthamiana*. Essa associação é provavelmente necessária para que ocorra a interação com a proteína N, de modo a direcionar os complexos RNP para o plasmodesmata ([Leastro et al., 2015](#)). Apesar da escassez de informações sobre o sítio de replicação, um recente estudo com TSWV identificou a proteína hospedeira eEF1A, como um fator crucial para garantir a transcrição e a replicação viral ([Komoda et al., 2014](#)).

Estudos comparativos empregando a tecnologia de RNA-seq vêm proporcionando um maior detalhamento sobre o repertório de genes diferencialmente expressos em vários patossistemas ([Adhikari et al., 2012](#); [Van Verk et al., 2013](#); [Chen et al., 2013](#); [Goyer et al., 2015](#); [Tan et al., 2015](#)). Entretanto, apenas poucos estudos de expressão gênica diferencial são

relatados envolvendo tospovírus (Catoni *et al.*, 2009; Nachappa *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015; Gamage *et al.*, 2016). Embora causando doenças economicamente importantes, pouco se sabe sobre os mecanismos de patogênese e as mudanças no perfil de expressão gênica induzidos por espécies de *Tospovirus* nas diferentes hospedeiras dentro do gênero *Solanum*. Estes estudos também são escassos em tomateiro (Catoni *et al.*, 2009; Nachappa *et al.*, 2013) e ausentes para patossistemas envolvendo a espécie viral GRSV.

Neste contexto, é de fundamental importância elucidar quais alterações no perfil de expressão gênica que são induzidas em cultivares suscetíveis de tomateiro por tospovírus durante o processo de infecção, a fim de identificar genes chaves que são ativados/desativados na interação compatível vírus-planta. Desta forma, o principal objetivo do presente trabalho foi catalogar os genes hospedeiros diferencialmente expressos (DEGs) na interação compatível entre *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’ (uma variedade de tomateiro altamente suscetível) e um isolado de GRSV usando informações geradas pela tecnologia de RNAseq.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização dos bioensaios – Os ensaios foram realizados em casa de vegetação e nos Laboratórios de Virologia, Análise Genômica e Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças em Brasília–DF. A síntese e o sequenciamento das bibliotecas de RNAseq foram realizados no Centro de Genômica Funcional ESALQ/USP.

Obtenção e preparo do inóculo para os bioensaios – Para este experimento foi utilizado um isolado de GRSV obtido a partir de frutos de tomateiro apresentando sintomas severos de anéis concêntricos no Campo Experimental da Embrapa Hortaliças (Brasília–DF). Este isolado foi selecionado pela extrema agressividade em plântulas de tomateiro e identificado por meio de

testes sorológicos, biológicos e moleculares. Plantas de *Datura stramonium* L. foram utilizadas como fontes multiplicadoras de inóculo de GRSV, visando posterior inoculação nas plantas de tomateiro cultivar ‘Santa Clara’. A inoculação foi realizada utilizando-se extrato vegetal preparado a partir de frutos de tomateiro sintomático macerado em tampão de inoculação contendo fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,01 M e sulfito de sódio (NaSO_3) 1% (P/V) em água destilada. A proporção do tecido vegetal/tampão usada foi de 1:10.

Material vegetal e inoculação com um isolado de GRSV – Um estudo do transcriptoma da interação compatível entre a cultivar ‘Santa Clara’ e GRSV foi conduzido com a finalidade de identificar genes regulados positivamente e negativamente, ou seja, quais genes poderiam ser inibidos ou induzidos neste acesso suscetível após infecção com GRSV. Para isto, sementes de uma seleção da cultivar ‘Santa Clara’ (denominada ‘CNPH 1496’) foram semeadas em bandeja de 128 células contendo substrato Plantmax[®]. Aos 21 dias após a germinação das sementes, as plântulas foram transplantadas para vasos de 1,5 litros contendo solo autoclavado. As plantas com dois pares de folhas verdadeiras foram polvilhadas com *carborundum* (400 mesh) e mecanicamente inoculadas com extrato de folhas sintomáticas previamente infectadas com GRSV. Todas as folhas foram inoculadas. O extrato infeccioso foi preparado com 1g de folhas frescas e sintomáticas de *D. stramonium*, macerado em 10 mL de tampão de inoculação contendo 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. Plantas da variedade ‘Santa Clara’ (= ‘CNPH 1496’) inoculadas apenas com o extrato de plantas de *D. stramonium* sadias (*mock*-inoculadas) foram utilizadas como controle do experimento. Plantas de *D. stramonium* foram utilizadas como controles da viabilidade do inóculo.

Coletas de amostras para análise do transcrito da interação *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’-GRSV – Amostras foliares de plantas da variedade ‘Santa Clara’ (= ‘CNPH 1496’) inoculadas mecanicamente com o vírus e *mock*-inoculadas foram coletadas a 0, 3, 5, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI). A coleta realizada no período zero (0DAI) foi realizada uma hora após a inoculação. A coleta de amostras foi realizada através do corte do pecíolo das folhas utilizando lâminas esterilizadas. Após a coleta, as amostras foliares foram acondicionadas em tubos Falcon[®] (com a identificação correspondente) e imediatamente resfriados em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até o processamento. Este procedimento foi realizado para todas as repetições e para todos os períodos de coleta. Os períodos de coletas foram definidos com base em um estudo realizado por **Hagen et al. (2011)**, os quais demonstraram elevada acumulação de TSWV em plantas de tomateiro dos quatro aos dez dias após a inoculação. Dessa forma, os períodos de coletas foram estabelecidos para o estudo da interação compatível entre tomateiro-GRSV. Este experimento foi conduzido em triplicata (**Tabela 1**).

Apenas o período 3-5DAI do tratamento controle foi utilizado para construção das bibliotecas de cDNA. Com relação ao tratamento inoculado todos os períodos de inoculação foram considerados para a construção das bibliotecas, entretanto, após a extração do RNA, análise da concentração e qualidade foi estabelecido um ‘*pool*’ equimolar entre os períodos 3-5 dias (3-5DAI) e 7-10 dias (7-10DAI), com a finalidade de reduzir o número final de bibliotecas.

Tabela 1 – Representação esquemática dos tempos de coleta de material vegetal para análise do transcrito na interação compatível entre *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’ (= ‘CNPH 1496’) – *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

Tratamentos	Períodos de coleta				
	0 (dai)	3 (dai)	5 (dai)	7 (dai)	10 (dai)
CNPH 1496 + virus	5 plantas/3rpl*	5 plantas/3rpl	5 plantas/3rpl	5 plantas/3rpl	5 plantas/3rpl
CNPH 1496 + mock	5 plantas/3rpl	5 plantas/3rpl	5 plantas/3rpl	5 plantas/3rpl	5 plantas/3rpl
Tratamentos	Construção das bibliotecas				
	0 (dai)	3-5 (dai)	7-10 (dai)		
CNPH 1496 + virus	3**	3	3		
CNPH 1496 + mock	-	3	-		

* O experimento foi conduzido em triplicatas (três réplicas) com cinco plantas para cada período.

** Foram sequenciadas três bibliotecas para cada período avaliado, as quais constituem as repetições técnicas.

Extração do RNA total – As amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido para fins de extração de RNA total usando o reagente TRIzol[®] (Ambion), de acordo com o protocolo resumido a seguir. Alíquotas de 100 mg de tecido foliar triturado até a obtenção de um pó extremamente fino foram acondicionadas em microtubos (pré-resfriados em nitrogênio líquido) com capacidade para 2 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL de TRIzol[®] em cada amostra. As misturas resultantes foram homogeneizadas (em temperatura ambiente) por 5 minutos, permitindo a dissociação das nucleoproteínas. Posteriormente foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio a cada microtubo, com posterior homogeneização manual por 30 segundos. As amostras foram incubadas por 2-3 min à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa superior (contendo o RNA) foi transferida para novo microtubo e procedeu-se com precipitação do RNA pela adição de 0,5 mL de isopropanol e centrifugação das amostras a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Ao final da

centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram novamente centrifugadas (7.500 rpm a 4°C por 5 min) e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram parcialmente secos à temperatura ambiente, dissolvidos em 50 µL de água RNase free (SIGMA) e armazenados em *freezer* -80 °C até o envio para análise. A concentração e a qualidade das amostras de RNA total foram estimadas por espectrofotometria, no equipamento NanoDrop® LITI (Thermo Scientific), nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Foram consideradas como amostras de boa qualidade apenas aquelas que apresentaram valores da razão de absorvância (A_{260}/A_{280}) >1,8. A integridade das amostras foi também confirmada por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% com a adição de hipoclorito de sódio 2% em tampão TAE 1x. O resultado da eletroforese foi visualizado sob luz UV e digitalizado utilizando-se o equipamento de fotodocumentação *Multi Doc-It Digital Imaging System* (UVP). Este gel de agarose com adição de hipoclorito de sódio substitui o gel com formaldeído comumente utilizado para verificar a integridade de RNAs. O hipoclorito de sódio desnatura estruturas secundárias de RNA pela ruptura de pontes de hidrogênio e elimina RNases presentes no gel (Aranda *et al.*, 2012). Após a análise da concentração e da qualidade do RNA as amostras foram acondicionadas em uma caixa de isopor contendo gelo seco e em seguida encaminhadas para o Centro de Genômica Funcional ESALQ/USP, São Paulo, para preparação das bibliotecas e sequenciamento. Todo o procedimento foi monitorado, já que a ESALQ permite que o estudante participe de toda a metodologia utilizada para o RNAseq.

Preparo das amostras de RNA – As bibliotecas de RNAseq foram preparadas a partir de uma concentração de 500 ng/µL de RNA total de cada amostra. A qualidade do RNA foi verificada de forma adicional utilizando o equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent) e o protocolo Agilent RNA 6000 Nano Assay. A construção das bibliotecas de *RNAseq paired-end* foi feita usando o *kit*

TruSeq RNA Sample Prep v2 LS Protocol (Illumina), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante e resumidamente descritos a seguir.

Purificação e fragmentação do mRNA – O mRNA foi purificado a partir da preparação obtida de RNA total, empregando *beads* magnéticas ligadas a moléculas poli-T complementares à cauda poli-A, presente no mRNA. Para isto, foi utilizado o kit *RNA purification beads* (Illumina). Primeiramente, as *beads* foram ressuspensas em vórtex e em seguida foram adicionados 50 µL da solução a cada amostra. As amostras contendo RNA total e as *beads* foram homogeneizadas por pipetagem e submetidas à desnaturação em termociclador (65 °C por 5 min, com finalização a 4 °C). Posteriormente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente (5 min), permitindo a ligação das *beads* à cauda poli-A do mRNA. A placa contendo o complexo *beads*-mRNA foi colocada sobre um suporte magnético para separá-lo do restante da solução. Nesta etapa os *beads*-mRNA permaneceram aderidos à lateral da placa, enquanto o volume total da solução foi removido por pipetagem. Em seguida, realizou-se a limpeza das amostras usando o kit *Bead Washing Buffer* (200 µL) (Illumina). As amostras foram homogeneizadas por pipetagem e novamente colocadas no suporte magnético (5 min) para separação da solução de limpeza, moléculas de rRNA e demais contaminantes. Após a limpeza foi feita a separação do mRNA das *beads* pela adição de 50 µL de *Elution Buffer* (kit Illumina) às amostras, com posterior incubação no termociclador a 80°C por 2 min. O mRNA purificado foi novamente ligado a *beads* magnéticas, pela a adição de 50 µL de *Bead Binding Buffer* (kit Illumina) às amostras e posterior incubação à temperatura ambiente (5 min). A placa de amostras foi então colocada sobre o suporte magnético, todo o sobrenadante foi descartado, e o complexo *beads*-mRNA foi lavado utilizando *Bead Washing Buffer* (200 µL). Posteriormente, a placa foi colocada sobre o suporte magnético (5 min) e o sobrenadante descartado. Em cada amostra foram adicionados 19,5 µL de

Elute, Prime, Fragment Mix (kit Illumina). Realizou-se a homogeneização por pipetagem e estas foram levadas ao termociclador (94°C por 8 min, com finalização a 4°C) para a eluição, fragmentação e preparo do mRNA para a síntese de cDNA.

Síntese do cDNA – As amostras foram retiradas do termociclador e colocadas sobre o suporte magnético por 5 min. Em seguida, 17 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de PCR. A primeira fita do cDNA foi sintetizada por meio da adição de 1 µL da transcriptase reversa *Super Script II* e 7 µL de *First Strand Master Mix* (kit Illumina) às amostras. A segunda fita foi sintetizada utilizando o kit de *Second Strand Master Mix* (25 µL) (Illumina). O cDNA foi sintetizado à temperatura de 16°C por 60 min em termociclador. Posteriormente, procedeu-se com as etapas de limpeza do cDNA utilizando *AMPure XP beads* (kit Illumina).

Reparo dos terminais 3' e 5' e adenilação da extremidade 3' – O reparo das extremidades do cDNA, resultantes da fragmentação do RNA foi feito pela ação de enzimas polimerases e exonucleases que promovem o preenchimento das extremidades 5' e a remoção das bases excedentes da extremidade 3' permitindo, assim, a ligação dos adaptadores. Nesta etapa foi utilizado o kit *End Repair Mix* (kit Illumina). Após a obtenção de extremidades *blunt* procedeu-se com a adenilação das extremidades 3' utilizando o kit *ATailing Mix* (Illumina). A adição de uma adenina aos fragmentos *blunt* evita que se liguem entre si durante a etapa de ligação dos adaptadores. Estes, por sua vez, possuem uma timina na extremidade 3', que é complementar à adenina do fragmento *template*, favorecendo a ligação.

Ligação dos adaptadores e sequenciamento das bibliotecas – Nesta etapa ocorreu a ligação de adaptadores com múltiplos *index* às extremidades do cDNA, possibilitando sua hibridização à

flowcell de sequenciamento. De acordo com cada amostra a ser sequenciada foi adicionado um adaptador diferente *RNA Adapter Index* (AR001-AR012) (kit Illumina). Após a ligação dos adaptadores foi feita uma amplificação para selecionar e aumentar o número de cópias dos fragmentos de cDNA que possuem adaptadores ligados às duas extremidades. Para isso, foi utilizado na PCR um coquetel de *primers* (*Primer Cocktail*) complementares aos adaptadores utilizados. Posteriormente, foi realizada a avaliação de qualidade das bibliotecas usando o equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent). Em seguida, procedeu-se a quantificação por PCR quantitativa (qPCR), usando a metodologia descrita em *Sequencing Library qPCR Quantification Guide* (Illumina) e o termociclador StepOne (Applied Biosystems®). Após a quantificação das bibliotecas, o sequenciamento se deu no aparato HiSeq2500 (Illumina). Foram sequenciadas 12 bibliotecas por *lane* da *flowcell*, em uma concentração inicial de 17 pM de DNA por *lane*.

Análise de bioinformática dos dados de RNAseq e alinhamento dos reads ao genoma de

referência – As análises de bioinformática foram feitas no laboratório Análise Genômica da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. O sequenciamento das 12 bibliotecas gerou dados em formato Illumina FASTQ que foram analisados com o uso dos softwares *SeqMan NGene* e *ArrayStar* da DNASTar Lasergene (Madison-WI). Análises de qualidade das sequências, eliminação de adaptadores e mapeamento ao genoma de referência foram procedimentos feitos automaticamente no software *SeqMan NGene* seguindo-se o *default* do programa. As sequências obtidas foram mapeadas ao genoma de referência de *S. lycopersicum* ‘Heinz 1706’ (version SL.2.50) e anotações ITAG2.4 disponíveis na plataforma ‘Sol Genomics’ (https://solgenomics.net/jbrowse_solgenomics/).

Análise quantitativa da expressão gênica – As sequências mapeadas (*reads counts*) foram usadas para determinação da expressão gênica diferencial, utilizando o software *ArrayStar* (Lasergene, DNASTAR). Os *reads counts* foram normalizados usando o método RPKM (*reads per million kilobases per million mapped reads*) (Mortazavi *et al.*, 2008). Os genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando t-testes com FDR (*False Discovery Rates*) para correção de valores de significância (Benjamini & Hochberg, 1995). Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com variação de expressão (*fold change*) superior a dois entre amostras, com significância estatística (*p-value*) menor ou igual a 0,05%.

Anotação das sequências gênicas – A anotação das bibliotecas de expressão foi realizada a partir da determinação da função das sequências gênicas contra as quais as bibliotecas foram mapeadas. Para isso, foi utilizado o software Blast2GO PRO versão 4.0 (Conesa *et al.*, 2005). As sequências foram comparadas com aquelas presentes no banco de dados do NCBI, empregando o algoritmo cloudBLASTx e considerando um número máximo de 20 hits por entrada e o *Expect Value* mínimo de 10^{-6} (*Evalue* $<10^{-6}$). Em seguida, realizou-se o mapeamento dos termos do Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2000) e a anotação das sequências, usando os parâmetros *default* do Blast2GO.

RESULTADOS

Mapeamento dos *reads* no genoma de referência do tomateiro – O sequenciamento das 12 bibliotecas de RNAseq gerou aproximadamente 410 milhões de *paired-reads*, dos quais 396.2 milhões foram mapeados no genoma do tomateiro, correspondendo a um total de 96,63% das sequências obtidas após o processamento. Aproximadamente 13,6 milhões de *reads* não foram mapeadas ao genoma de referência. As 12 bibliotecas incluindo o tratamento inoculado e não

inoculado geraram um total de 67.1 mil *reads* considerados como de baixa qualidade (**Tabela 2**). O controle *mock* inoculado gerou um total de 95.6 milhões de *reads* e as amostras inoculadas coletadas a 0DAI, 3-5DAI e 7-10DAI geraram 107.9, 109.3 e 97.0 milhões de *reads*, respectivamente. O menor número de sequências geradas ocorreu nas bibliotecas do controle *mock* inoculado. Entre os tratamentos inoculados o maior número de *reads* gerados ocorreu no período 3-5DAI (**Tabela 2**). O sequenciamento de todas as bibliotecas possibilitou a identificação de 29.390 genes, que corresponde a 84,5% do total de genes presentes no genoma de tomateiro (34.761 genes).

Tabela 2 – Descrição do número total de *reads* em cada biblioteca de expressão, *reads* mapeados e não mapeados no genoma de referência de *Solunum lycopersicum* e *reads* de baixa qualidade.

Biblioteca	Número total de reads	Total de reads mapeados	Total de reads não mapeados	Reads de baixa qualidade
0DAI-Mock (R1)*	32.005,178	31.007.372	993.241	4.565
0DAI-Mock (R2)	30.497.462	29.529.930	962.435	5.097
0DAI-Mock (R3)	33.169.314	32.108.808	1.054.338	6.168
Total	95.671.954	92.646.110	3.010.014	15.830
0DAI-GRSV (R1)	36.423.814	34.492.084	1.926.755	4.975
0DAI-GRSV (R2)	38.577.166	37.287.384	1.284.235	5.547
0DAI-GRSV (R3)	32.917.920	31.817.121	1.095.518	5.281
Total	107.918.898	103.596.588	4.306.506	15.861
3-5DAI-GRSV (R1)	31.406.966	30.523.913	875.077	7.976
3-5DAI-GRSV (R2)	39.079.462	37.763.472	1.310.061	5.929
3-5DAI-GRSV (R3)	38.815.466	37.533.709	1.276.035	5.722
Total	109.301.892	105.821.094	3.461.172	19.626
7-10DAI-GRSV (R1)	31.996.054	30.934.459	1.056.581	5.014
7-10DAI-GRSV (R2)	32.732.478	31.904.841	822.142	5.495
7-10DAI-GRSV (R3)	32.307.280	31.333.943	968.060	5.277
Total	97.035.810	94.173.243	2.846.711	15.786

*Replicatas técnicas de cada biblioteca.

Análise quantitativa da expressão gênica – As análises dos dados de expressão gênica mostraram que 9.206 genes foram diferencialmente expressos na interação *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’ – GRSV com relação ao controle *mock* inoculado. A variação nos níveis de expressão gênica entre dois grupos foi analisada através do uso de *Scatter plots* gerados no Programa Arraystar, considerando a *fold change* ≥ 2 e *p value* $\leq 0,05$. A análise dos DEGs foi

feita através de comparações entre os períodos de coletas (0DAI, 3-5DAI e 7-10DAI) da cv. ‘Santa Clara’ inoculada com GRSV *versus* o controle *mock* inoculado.

Foi identificado um total de 5.562 DEGs na comparação de genes diferencialmente expressos no período 0DAI, dos quais 2.026 foram negativamente regulados e 3.536 positivamente regulados, mostrando que no período inicial da interação, 57% dos genes estavam superexpressos em relação ao controle *mock* inoculado. Na avaliação feita a 3-5DAI foram identificados 5.283 DEGs na cv. ‘Santa clara’ inoculada com GRSV em relação ao controle *mock* inoculado, dos quais 4.185 foram negativamente regulados e 1.097 positivamente regulados. Neste período houve uma redução na expressão gênica, apenas 26% dos DEGs foram positivos na interação cv. ‘Santa Clara’-GRSV. Aos 7-10DAI foram identificados 3.924 genes com expressão diferencial, desse total, 2.398 foram negativos e 1.526 positivos.

Após a identificação dos DEGs na interação cv. ‘Santa Clara’- GRSV em cada período comparando-se com o controle *mock* inoculado, foi realizada outra análise utilizando o diagrama de Venn para identificar os genes exclusivamente expressos em cada período de coleta e analisar os DEGs comuns entre os três períodos avaliados (0DAI, 3-5DAI e 7-10DAI). O número de genes diferencialmente expressos exclusivamente na condição 0DAI (2.532 genes) foi maior do que nas demais comparações, desse total, 1.867 genes foram positivamente regulados e 665 negativamente regulados. Um total de 1.862 DEGs foi exclusivamente expresso no período 3-5 DAI em relação ao controle *mock* inoculado (228 positivos e 1.634 negativos) e 698 DEGs foram exclusivamente expressos no período 7-10DAI, dos quais 406 foram positivos e 389 negativos (Figura 1).

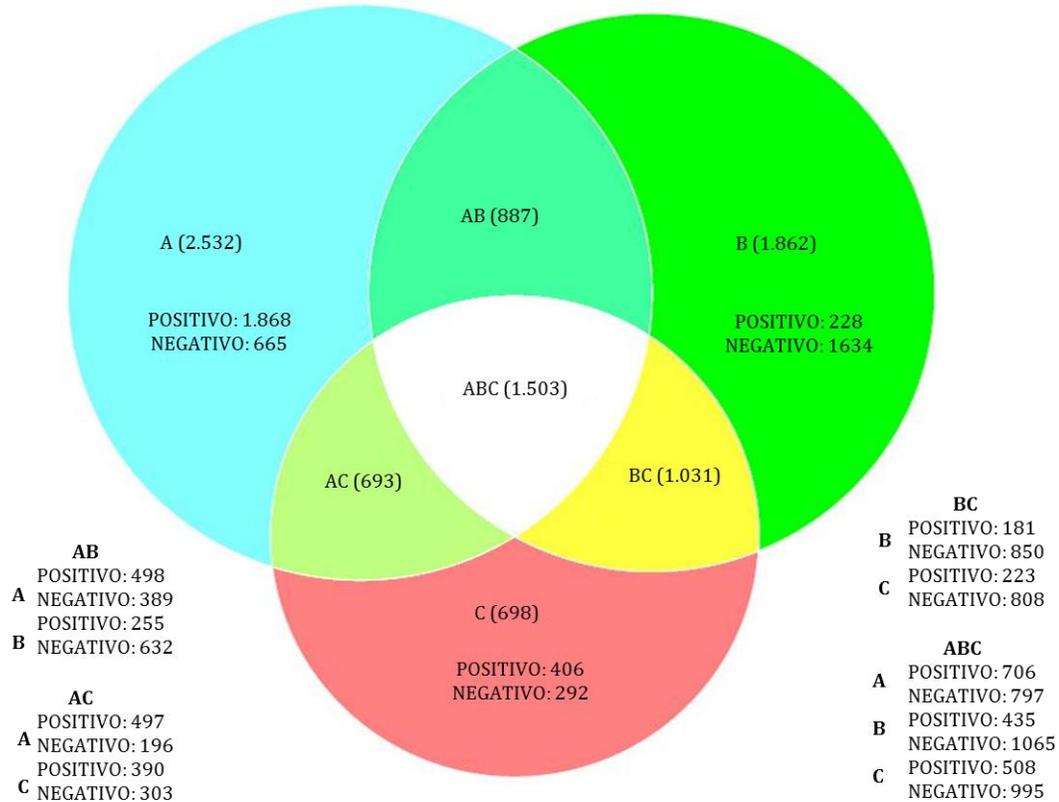


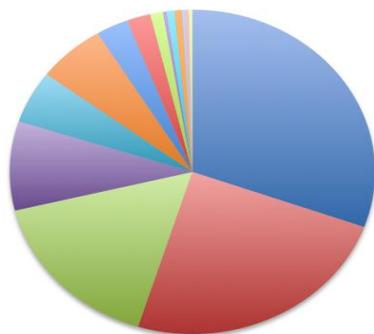
Figura 1 – Diagrama de Venn mostrando a intersecção entre os conjuntos de dados e o número de genes diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) amostrados a 0DAI (dias após a inoculação) (**A**), 3-5DAI (**B**) e 7-10DAI (**C**). Na parte interna do diagrama estão os genes positivos e negativos exclusivamente expressos nos períodos 0DAI, 3-5DAI e 7-10DAI. Nas laterais do diagrama está assinalado o número de genes positivos e negativos regulados nas intersecções (**AB**, **AC**, **BC** e **ABC**), ou seja, os genes comumente expressos entre os diferentes períodos de coleta.

Anotação funcional e classificação dos genes diferencialmente expressos nos três períodos

avaliados – A classificação funcional dos DEGs envolvidos na resposta do tomateiro à infecção por GRSV foi feita por meio do Gene Ontology (GO) usando o software Blast2GO PRO. Os DEGs foram agrupados nas categorias de processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares.

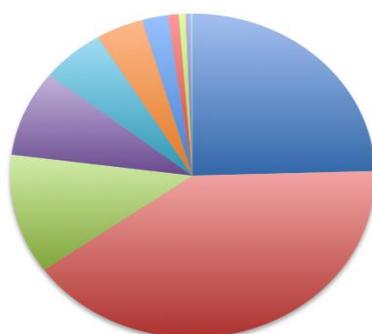
0DAI – Dos 5.615 genes diferencialmente expressos no período 0DAI, 2.681 genes foram anotados de acordo com os termos do Gene Ontology. Dentre esses genes, 1.750 foram anotados na categoria de componentes celulares, 1.788 em processos biológicos e 2.159 genes foram anotados em funções moleculares. Dentro da categoria de componentes celulares as subcategorias com o maior número de DEGs foram ‘partes da célula’ (40,6%), ‘organelas’ (24,5 %) e ‘ partes da membrana’ (12%). Na categoria de processos biológicos a maioria dos DEGs foi anotada nas subcategorias de ‘processos metabólicos’, ‘processos celulares’, ‘processos de um único organismo’, ‘regulação biológica’, ‘localização’, ‘respostas a estímulos’ e ‘processos de desenvolvimento’. O maior número de genes diferencialmente expressos no período 0DAI foi anotado dentro da categoria de função molecular, sendo a subcategoria de ‘atividade catalítica’ a mais representativa, seguida da subcategoria de ‘ligação/*binding*’. Ainda na categoria de função molecular os DEGs foram anotados nas subcategorias de ‘fator de transcrição de ligação a ácido nucleico’, ‘transporte’, ‘transdução de sinais’ e ‘fator de transcrição de ligação a proteínas’ (**Figura 2**). A análise dos 20 genes com maiores níveis de expressão no período 0DAI demonstrou que estes estavam envolvidos em componentes celulares e processos biológicos como regulação biológica, processos celulares, processos metabólicos e resposta a estímulos. O gene com o maior nível de expressão está associado com atividade de oxirredutase (*Leucoanthocyanidin dioxygenase-like*) (**Tabela 3**).

BIOLOGICAL PROCESS



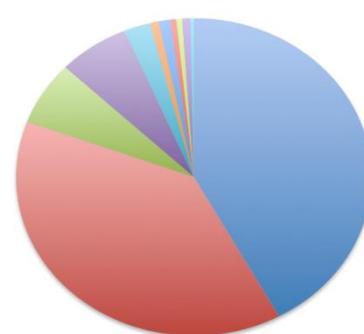
- Metabolic process (30.5%)
- Cellular process (24.3%)
- Single-organism process (16.3%)
- Biological regulation (8.9%)
- Localization (7.2%)
- Response to stimulus (6.0%)
- Developmental process (2.8%)
- Cellular component organization (2.1%)
- Reproduction (1.1%)
- Detoxification (0.3%)
- Reproductive process (0.7%)
- Multicellular organismal process (0.7%)
- Immune system process (0.3%)

CELLULAR COMPONENT



- Organelle (24.5%)
- Cell part (40.6%)
- Membrane part (12.0%)
- Membrane (8.6%)
- Macromolecular complex (5.7%)
- Extracellular region (4.2%)
- Organelle part (2.3%)
- Cell (0.9%)
- Extracellular region part (0.6%)
- Cell junction (0.4%)

MOLECULAR FUNCTION



- Catalytic activity (42.0%)
- Binding (38.6%)
- Transcription factor (6.5%)
- Transporter activity (6.5%)
- Molecular function regulator (2.4%)
- Transcription factor, protein binding (0.8%)
- Signal transducer activity (1.0%)
- Electron carrier activity (2.1%)
- Antioxidant activity (0.5%)
- Structural molecule activity (0.7%)

Figura 2 – Distribuição dos termos de ontologia nas categorias ‘processo biológico’, ‘função molecular’ e ‘componente celular’ para os genes diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) obtidos das bibliotecas do período ODAI (dias após a inoculação).

Tabela 3 – Listagem dos 20 genes com maiores níveis de regulação positiva (campo branco) e negativa (campo cinza) no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) a **0DAI**.

Genes positivamente regulados			Genes negativamente regulados		
Código do gene	Produto do gene	Fold change	Código do gene	Produto do gene	Fold change
LOC101248924	Leucoanthocyanidin dioxygenase-like	10450.189	LOC104646449	---NA---	584.349
LOC101252609	TIFY 5A-like	8856.368	LOC101248647	Kunitz-type protease inhibitor precursor [<i>Solanum tuberosum</i>]	418.493
LOC101259680	Transcription factor bHLH120-like	4736.723	LOC101266528	Ase inhibitor PSI- -like	349.797
LOC101252907	TIFY 5A-like	2779.779	LOC101250998	Actin, partial	325.714
LOC104644406	kDa class I heat shock –like	2416.167	LOC778321	Pathogenesis-related STH-2-like	225.974
LOC101258312	Metallothiol transferase –like	1986.756	TSI-1	Pathogenesis-related STH-2-like	224.131
LOC101263186	AP2 domain CBF	1479.198	LOC101254173	Ribosomal L16 (mitochondrion)	175.020
LOC104648933	Beta-1,6-galactosyltransferase GALT31A	1209.590	LOC101246607	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP59-like	169.763
LOC101246841	Ethylene-responsive transcription factor ERF017-like	1201.344	LOC104645432	---NA---	161.472
LOC101252357	Ethylene-responsive transcription factor ERF071-like	1180.324	LOC101259046	Transcription factor JUNGBRUNNEN 1-like	160.166
LOC101253257	Ethylene-responsive transcription factor ERF017-like	1115.531	MIR172b	---NA---	152.039
LOC101257598	Monothiol glutaredoxin-S2-like	1013.804	MIR166b	---NA---	150.303
LOC101268766	Ethylene-responsive transcription factor erf017	949.175	LOC101256076	Isoflavone 2 -hydroxylase-like	147.143
LOC101253038	LE25-like [<i>Nicotiana tomentosiformis</i>]	943.550	LOC101267026	Stigma-specific STIG1 1	146.389
LOC101264332	HVA22 e	942.502	LOC104645998	Leucine-rich repeat extensin 6	127.274
LOC104649733	TIFY 5A-like [<i>Nicotiana tabacum</i>]	889.999	LOC101247402	Homeobox 2-like	122.538
LOC101267202	Calcium-binding CML19	877.526	LOC101260225	Patatin 2	120.426
LOC104645813	Heat stress transcription factor A-9 [<i>Tarenaya hassleriana</i>]	840.439	LOC101266972	Probable glutathione S-transferase	117.529
LOC101268544	Probable indole-3-acetic acid-amido synthetase	832.116	MIR171c	---NA---	114.947
LOC101246484	Ethylene-responsive transcription factor ERF109-like	832.003	LOC104647134	RNase H Family	111.309

3-5DAI – Um total de 2.336 genes diferencialmente expressos a 3-5DAI foram anotados de acordo com os termos do Gene Ontology. O maior número de DEGs foi agrupado na categoria de funções moleculares, os quais foram distribuídos dentro de nove subcategorias, onde as mais representativas foram ‘atividade catalítica’ e ‘ligação/*binding*’. Os demais DEGs foram anotados nas subcategorias de ‘transporte’, ‘fator de transcrição de ligação a ácido nucleico’, ‘regulador de funções moleculares’, ‘atividade molecular estrutural’ e ‘transdução de sinal’. Dos 2.336 genes anotados com base no *Gene Ontology* no período 3-5DAI, 1.433 foram agrupados nas classes de componentes celulares e 1.442 em processos biológicos, respectivamente. Em processos celulares as subcategorias de ‘célula’ (44,3%), ‘organela’ (27,6%) e ‘membranas’ (7,8%) foram as mais representativas, contendo o maior número de genes. Na classe de processos biológicos os DEGs foram anotados em 14 subcategorias, incluindo ‘processos metabólicos’, ‘processos celulares’, ‘processos de organismo único’, ‘resposta a estímulos’, ‘processos de desenvolvimento’, ‘regulação biológica’, ‘biogênese’, ‘localização’, dentre outras (**Figura 3**). Os 20 genes mais expressos no período 3-5DAI foram relacionados com atividade de transporte transmembranar, atividade de peptidase (*miraculinn like*) processos catabólicos, metabolismo de lipídeos (*Phospholipase D delta-like*) e processos de homeostase. O gene mais expresso está envolvido com o desenvolvimento embriogênico (**Tabela 4**). O gene **LOC104647250** (que codifica para a proteína *suppressor of gene silencing 3-like*) se posicionou entre os 20 genes negativamente regulados no período 3-5DAI. Esse gene está envolvido no silenciamento gênico postranscricional de vírus.

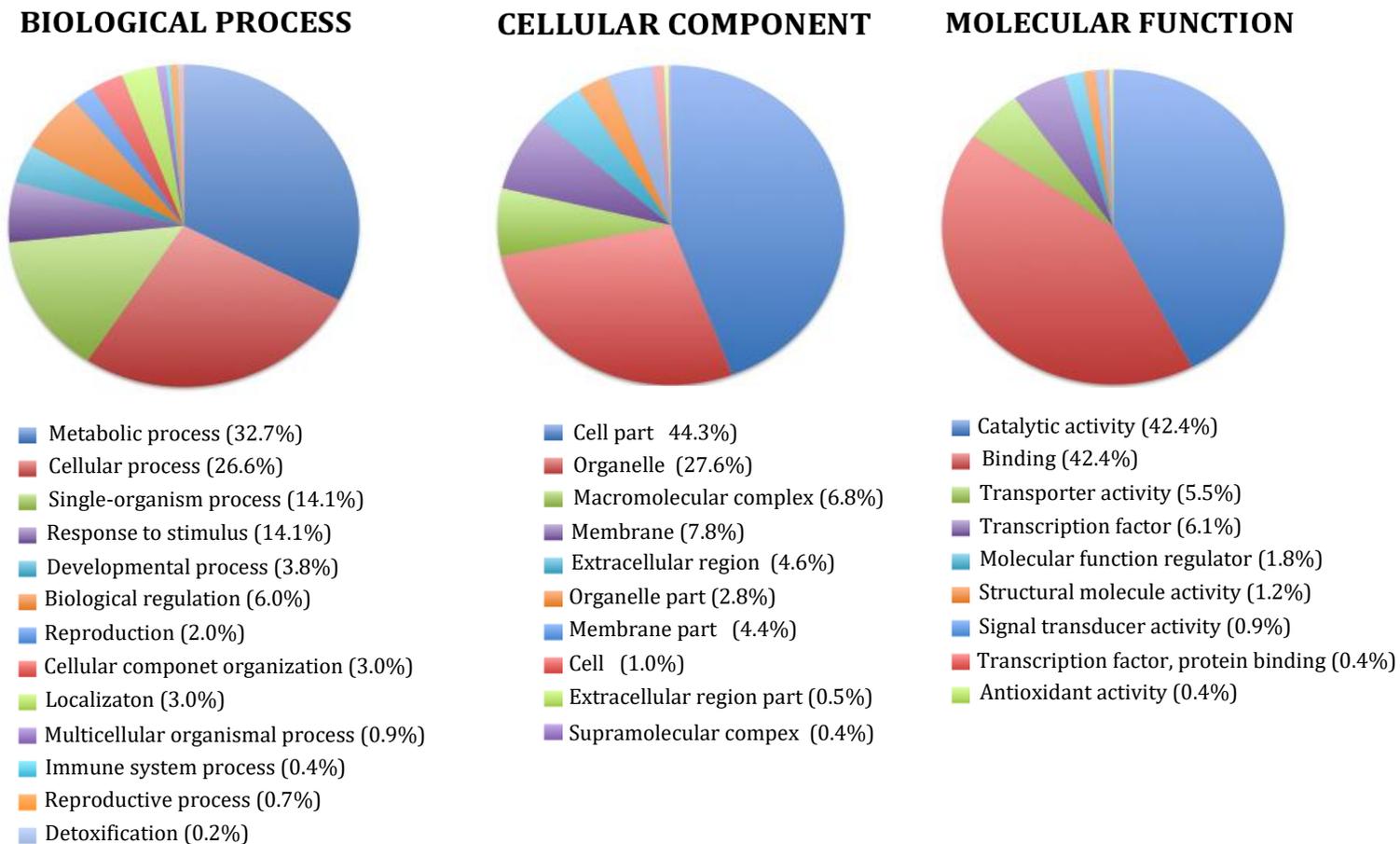


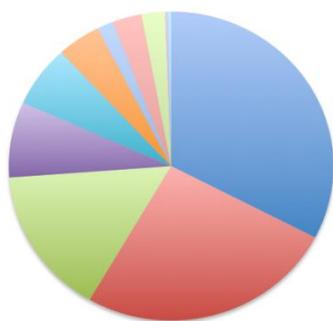
Figura 3 – Distribuição dos termos de ontologia nas categorias ‘processos biológicos’, ‘funções moleculares’ e ‘componentes celulares’ para os genes diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) obtidos das bibliotecas do período 3-5DAI (dias após a inoculação).

Tabela 4 – Listagem dos 20 genes com maiores níveis de regulação positiva (campo branco) e negativa (campo cinza) no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) aos 3-5DAI.

Genes positivamente regulados			Genes negativamente regulados		
Código do gene	Produto do gene	Fold change	Código do gene	Produto do gene	Fold change
LOC101253038	LE25-like [<i>Nicotiana tomentosiformis</i>]	667.996	LOC104644461	Transcriptional activator DEMETER-like	320.482
LOC104648941	---NA---	313.467	LOC104648679	Ankyrin repeat-containing At3g12360-like	313.961
LOC101260098	Gibberellin-regulated 11-like	212.642	LOC101266732	Rhodanese-like domain-containing mitochondrial	308.727
LOC101259166	Probable phosphatase 2C 12	187.438	LOC101257702	Glutathione transferase GST 23-like [<i>Solanum pennellii</i>]	255.250
Matriochka	Mini zinc finger 2-like [<i>Nicotiana tabacum</i>]	155.232	LOC101257466	Probable signal peptidase complex subunit 2	249.437
LOC101261398	Miraculin-like	150.357	LOC104648076	Heterogeneous nuclear ribonucleo 1-like	237.138
LOC104648091	Ras-related RABB1b	148.883	MIR5301	---NA---	203.808
LOC101246053	Germin subfamily 1 member 1	146.445	LOC104645473	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104645401	175.000
LOC101253431	Germin 2-1	132.629	LOC104648678	PREDICTED: uncharacterized protein LOC107006425	168.401
LOC101260259	Dt1 [<i>Glycine max</i>]	131.127	LOC104647936	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing 3 isoform X1	166.232
LOC101247353	Expansin-like B1	120.979	LOC104645401	PREDICTED: uncharacterized protein	162.754
LOC101259795	Uridine nucleosidase 1 [<i>Jatropha curcas</i>]	95.145	MIR5303	---NA---	150.303
LOC101251096	Transcriptional regulator SUPERMAN-like	85.315	LOC104644516	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104103336, partial	147.107
LOC101251568	Major allergen Pru ar 1-like	82.914	LOC104645448	RNA polymerase II transcriptional coactivator KIWI-like	131.121
LOC101261679	Non-specific lipid-transfer 2-like	74.294	LOC104646590	---NA---	127.432
LOC101250514	Probable aquaporin TIP3-2	73.589	LOC104647345	PREDICTED: uncharacterized protein LOC108945762	126.672
LOC101249492	Germin subfamily 1 member 17	65.580	LOC104646839	Retrovirus-related Pol poly from transposon TNT 1-94	126.495
LOC104648820	Phospholipase D delta-like	64.076	LOC101250032	Flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like	117.529
LOC101267438	Aldose reductase	62.577	LOC101247402	Homeobox 2-like	114.947
LOC101260348	S-type anion channel SLAH2-like	61.920	LOC104647250	Suppressor of gene silencing 3-like	111.309

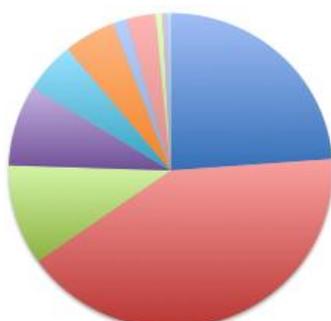
7-10DAI – No período 7-10DAI, dos 3.925 genes diferencialmente expressos 2.085 foram anotados nas três categorias funcionais do GO, ‘componentes celulares’ (1.266), ‘processos biológicos’ (1.304) e ‘funções moleculares’ (1.695). Dentro de ‘componentes celulares’, assim como nos demais períodos o maior número de DEGs foi agrupado nas subcategorias ‘partes da célula’ (41,4%), ‘organela’ (23,8%) e partes da membrana membranas (10,3%), sendo importante ressaltar a anotação de genes em outras subcategorias funcionais, entretanto de forma menos expressiva. O maior número de DEGs no período 7-10DAI foi anotado na categoria de funções moleculares, subcategorias ‘atividade catalítica’ (41.7%) e ‘ligação/binding’ (41.8%). E em processos biológicos as subcategorias com o maior número de DEGs foram processos metabólicos (32,7%), ‘processos celulares’ (25,7%) e processos de organismo único’(15,4%) (**Figura 4**). O gene com maior nível de expressão no período 7-10DAI (*Patatin precursor*) foi anotado na subcategoria ‘resposta de defesa’, e os demais estão envolvidos na regulação da transcrição, processos metabólicos de compostos nitrogenados (MADS-box) e organização e biogênese da parede celular (*Expansin-A3-like*) (**Tabela 5**). Assim como no período 3-5DAI o gene **LOC10464725** (*suppressor of gene silencing 3-like*) também foi encontrado com regulação negativa no período 7-10DAI.

BIOLOGICAL PROCESS



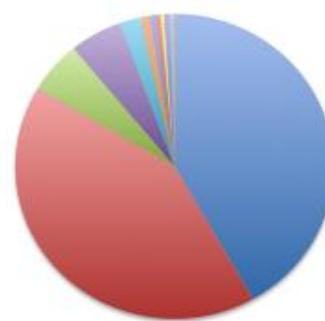
- Metabolic process (32.7%)
- Cellular process (25.7%)
- Single-organism process (15.4%)
- Biological regulation (7.9%)
- Response to stimulus (6.4%)
- Localization (6.0%)
- Reproduction (1.6%)
- Developmental process (2.9%)
- Cellular component organization (2.3%)
- Immune system process (0.3%)

CELLULAR COMPONENT



- Organelle (23.8%)
- Cell part (41.4%)
- Membrane part (10.3%)
- Membrane (8.3%)
- Extracellular region (5.2%)
- Macromolecular complex (2.8%)
- Cell (1.4%)
- Organelle part (2.9%)
- Extracellular region part (0.7%)
- Cell junction (0.6%)

MOLECULAR FUNCTION



- Catalytic activity (41.8%)
- Binding (41.7%)
- Transcription factor activity (5.6%)
- Transporter activity (5.3%)
- Molecular function regulator (2.2%)
- Structural molecule activity (0.9%)
- Electron carrier activity (0.9%)
- Transcription factor, protein binding (0.5%)
- Antioxidant activity (0.4%)
- Signal transducer activity (0.6%)
- Molecular transducer activity (0.3%)
- Nutrient reservoir activity (0.1%)

Figura 4 – Distribuição dos termos de ontologia nas categorias ‘processos biológicos’, ‘funções moleculares’ e ‘componentes celulares’ para os genes diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) obtidos das bibliotecas do período 7-10DAI (dias após a inoculação).

Tabela 5 – Listagem dos 20 genes com maiores níveis de regulação positiva (campo branco) e negativa (campo cinza) no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) aos **7-10DAI**.

Genes positivamente regulados			Genes negativamente regulados		
Código do gene	Produto gênico	Fold change	Código do gene	Produto do gene	Fold change
LOC101252795	Patatin precursor	430.886	LOC104644516	PREDICTED: uncharacterized protein	601.069
LOC101268579	Hypoxia-responsive family [<i>T. cacao</i>]	345.492	LOC101256272	kDa class IV heat shock -like	374.586
LOC101263186	AP2 domain CBF	338.203	LOC101247349	Replication A 70 kDa DNA-binding subunit B-Like isoform X1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	334.482
aco5	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	297.014	LOC104647214	Catalase isozyme 3-like	283.389
LOC104647997	Transcription factor (TF) UPBEAT1	245.235	LOC101256678	Non-specific lipid-transfer 1-like	262.867
LOC543885	Sepallata-like MADS box transcription	163.425	LOC101253780	Chaperone -like	237.994
LOC104645695	PREDICTED: uncharacterized protein	151.531	LOC101267718	Hippocampus abundant transcript 1	180.899
trnL-UAA	---NA---	149.034	LOC104647439	---NA---	177.885
LOC101253590	F-box kelch-repeat At3g23880-like	133.911	LOC101254954	Transcription factor bHLH84-like	173.738
LOC101262468	Expansin-A3-like [<i>Nicotiana tabacum</i>]	126.538	LOC104648678	PREDICTED: uncharacterized protein	168.401
LOC104649439	Voltage-gated hydrogen channel 1	121.879	LOC104649349	---NA---	153.218
LOC101256153	Hyoscyamine 6-dioxygenase-like	117.769	MIR5303	---NA---	150.303
LOC104645146	PREDICTED: uncharacterized protein	117.514	LOC101267026	Stigma-specific STIG1 1	146.389
MIR1919c	---NA---	114.429	LOC104647308	Hypothetical protein A4A49_35568	131.775
TRNAR-ACG	Ras guanine nucleotide exchange factor K	114.407	LOC101267996	Kirola-like	127.233
MIR482b	---NA---	110.901	LOC104647250	Suppressor of gene silencing 3-like	119.146
LOC104646792	UPF0481 At3g02645	107.536	LOC104646461	Yippee-like	116.706
TM29	MADS-box [<i>Solanum lycopersicum</i>]	64.076	LOC101250032	Flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like	114.947
LOC104645706	Truncated TF CAULIFLOWER A	62.577	LOC101247402	Homeobox 2-like	109.915
LOC101246053	Germin subfamily 1 member 1	61.920	LOC104647250	Suppressor of gene silencing 3-like	109.438

Análise de genes regulados positivamente nos diferentes períodos avaliados – Com base nas anotações dos genes de acordo com os termos do *Gene Ontology* foi feita uma análise apenas dos genes regulados positivamente nos períodos 0DAI, 3-5DAI e 7-10DAI, com o objetivo de identificar as funções gênicas que foram afetadas durante o processo infeccioso, ou seja, quais genes seriam “ligados” ou “desligados” no decorrer da infecção. No período 0DAI 1.741 genes estavam positivamente regulados entre um total de 2.026 com termos no *Gene Ontology*. Aos 3-5DAI foram identificados apenas 519 genes positivos, enquanto aos 7-10DAI foram identificados 882 genes positivamente regulados. Embora alguns genes não tenham sido agrupados nos termos do *Gene Ontology*, todos apresentavam a descrição da proteína correspondente.

Com relação a componentes celulares, no período 0DAI os genes regulados positivamente foram anotados em 11 subcategorias, entretanto, nos períodos 3-5DAI e 7-10DAI os genes foram anotados em apenas oito subcategorias. As subcategorias ‘partes da célula’, ‘organelas’, ‘partes das membranas’, ‘região extracelular’, ‘membrana’, ‘complexo de macromoléculas’ e ‘partes da região extracelular’ foram comumente expressas em todos os períodos, entretanto, as subcategorias ‘lumen da membrana’ e ‘junção celular’ foram expressas apenas no período 0DAI. Dentro de ‘junção celular’ estão os plasmodesmas, responsáveis pela conexão entre as células e transporte célula a célula dos vírus. Durante o processo de infecção proteínas de movimento se associam à membrana celular e alteram o limite de exclusão dos plasmodesmas, viabilizando o transporte célula a célula de ácidos nucleicos. No período 0DAI nove genes foram identificados e anotados dentro da subcategoria ‘plasmodesmas’ (**Tabela 6**). O gene EXLA1 que codifica a proteína *expansin-like a2*, um agente do afrouxamento/expansão celular, foi o mais superexpresso no período 0DAI, entretanto este gene não foi detectado como diferencialmente expresso nos demais períodos avaliados. No experimento todo foram identificados 42 genes associados com

plasmodesmas, incluindo os genes positivos e negativos. Ainda com relação a componentes celulares, dos genes positivamente regulados no período 3-5DAI, nenhum gene foi anotado na subcategoria ‘célula’ e no período 7-10DAI não houve genes anotados na subcategoria ‘partes de organelas’. No período 0DAI, 224 e 149 genes foram anotados nas subcategorias ‘partes da membrana’ e ‘membrana’, respectivamente, entretanto houve uma redução no número de genes diferencialmente expressos nestas subcategorias nos demais períodos. Aos 3-5DAI, apenas 40 genes foram identificados na subcategoria ‘membrana’ e 18 genes em ‘partes da membrana’ (**Tabela 7**).

Em funções moleculares os genes positivamente regulados relacionados com atividade ‘catalítica’, ‘ligação/*binding*’, ‘atividade de transporte’, ‘atividade de fatores de transcrição de ligação a nucleotídeos’, ‘reguladores de função molecular’ e ‘atividade molecular estrutural’ foram comumente expressos em todos os períodos avaliados. Dos genes positivamente regulados anotados na subcategoria ‘atividade de transdução de sinais’, foram identificados 23 genes apenas no período 0DAI, entre estes estão os genes que codificam para *mitogen-activated protein kinase, kinase kinase NPK1-like* (**LOC101266471**), *mitogen-activated protein kinase kinase kinase A-like* (**LOC101258387**) e *serine/threonine-protein kinase BLUS1-like* (**LOC101258902**) (**Tabela 8**). Nos períodos 3-5DAI e 7-10DAI não foram identificados DEGs positivamente regulados na subcategoria ‘fatores de transcrição de ligação a proteínas’, considerando a *fold change* ≥ 2 (**Tabela 9**). Estes dados mostram claramente que algumas funções moleculares foram “desligadas” no decorrer da infecção viral e estabelecimento da patogênese.

Com relação à categoria de processos biológicos os genes regulados positivamente nos três períodos (0DAI, 3-5DAI e 7-10DAI) foram comumente anotados dentro de várias subcategorias, incluindo ‘respostas a estímulos’, ‘processos metabólicos’, ‘processos celulares’, ‘processos de organismo único’, ‘regulação biológica’, ‘localização’, ‘processos de

desenvolvimento' e 'organização de componentes celulares'. No período 3-5DAI nenhum gene positivamente regulado foi anotado na subcategoria 'reprodução, 'processos multicelulares', 'detoxificação' e 'processo de multi-organismos'. As subcategorias 'detoxificação e 'reprodução' foram expressas apenas nos períodos 0DAI e 7-10DAI (**Tabela 10**).

Alguns genes associados com plasmodesmas, membranas, atividades de transdução de sinais, fatores de transcrição de ligação a proteínas e detoxificação celular estão descritos nas tabelas abaixo, incluindo os valores de *fold change* entre os três períodos avaliados. Além disso, os níveis de expressão gênica podem ainda ser visualizados através de um mapa de calor (*heat map*), calculado através de RPKM com base no sinal de expressão de cada gene incluindo os genes positivos e negativos, bem como aqueles com expressões semelhantes aos do controle *mock* inoculado (**Figuras 2-4**).

Tabela 6 – Total de genes associados aos ‘**plasmodesmas**’ que foram regulados positivamente no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) no período **0DAI**.

PLASMODESMAS				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
EXLA1	Expansin-like a2	5.444 (+)*	1.014 (+)	1.490 (+)
LOC101263787	Receptor-like serine threonine- kinase SD1-8	2.427 (+)	1.344 (+)	1.386 (-)
LOC101247486	Copper transporter 5	2.058 (+)	1.127 (+)	1.677 (+)
LOC101266291	Heavy metal-associated isoprenylated plant 26	5.402 (+)	1.515 (-)**	1.306 (+)
LOC101252344	L-ascorbate oxidase homolog	2.371 (+)	1.050 (+)	1.144 (+)
CRK1	Cysteine-rich receptor kinase 42	2.514 (+)	6.544 (-)	6.691 (-)
ACO1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	3.162 (+)	1.087 (-)	1.079 (-)
LOC101250189	B-cell receptor-associated 31-like	4.137 (+)	1.126 (-)	1.220 (-)
LOC101252861	L-ascorbate oxidase homolog	3.044 (+)	1.863 (+)	2.576 (+)

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

Tabela 7 – Relação de genes anotados na subcategoria ‘**membrana**’ que foram regulados positivamente no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) no período **3-5DAI**.

MEMBRANA				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
LOC101260259	Dt1 [<i>Glycine max</i>]	3.777 (+)*	76.798 (+)	3.896 (+)
LOC101250514	Probable aquaporin TIP3-2	13.299 (+)	43.099 (+)	none
LOC101260348	S-type anion channel SLAH2-like [<i>N. tomentosiformis</i>]	27.293 (+)	36.265 (+)	none
LOC101253294	Probable methyltransferase PMT2	None***	18.191 (+)	none
LOC101255546	Casparian strip membrane 1	None	13.594 (+)	4.519 (+)
LOC101253852	(1-3)-beta-glucan endohydrolase	2.663 (+)	12.863 (+)	2.087 (+)
LOC104648967	Cationic amino acid transporter chloroplastic-like	1.079 (-)**	9.975 (+)	10.576 (+)
LOC101266510	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 8-like	3.885 (+)	9.888 (+)	3.107 (+)
LOC101260345	Pleiotropic drug resistance 1-like	1.680 (+)	9.386 (+)	3.183 (+)
LOC101249450	ABC transporter G family member 23	None	8.813 (+)	28.493 (+)
LOC101259076	N3 [<i>Glycine max</i>]	16.259 (+)	7.652 (+)	18.065 (+)
LOC101267532	CASP 1F1	35.260 (+)	7.634 (+)	12.208 (+)
LOC101255120	DUF3511 domain [<i>Medicago truncatula</i>]	6.619 (+)	6.832 (+)	11.994 (+)
LOC101246640	Aquaporin TIP2-1	9.799 (+)	6.422 (+)	2.212 (+)
LOC778339	Inorganic phosphate transporter 1-11-like	1.957 (+)	5.047 (+)	2.343 (+)
LOC101247190	TRANSPARENT TESTA 12-like	1.422 (-)	4.406 (+)	7.518 (+)
LOC101268524	Desiccation-related PCC13-62-like	None	4.131 (+)	none
LOC101259363	CASP 4B1	None	4.050 (+)	none
LOC101243964	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GVI	None	3.654 (+)	none
LOC101263163	GPI-anchored LORELEI	None	3.647 (+)	4.486 (+)
LOC101268857	Lysine histidine transporter 2-like	None	3.609 (+)	none
LOC101247357	Calcium-dependent lipid-binding (domain) plant phosphoribosyltransferase family isoform 1 [<i>T. cacao</i>]	None	3.300 (+)	2.369 (+)
LOC101266990	GAMETE EXPRESSED 1	5.794 (+)	3.084 (+)	2.326 (+)
LOC104644451	CASP 4D1	300.444 (+)	3.057 (+)	none
PIN8	Auxin efflux carrier component 5	3.754 (+)	2.991 (+)	5.551 (+)
LOC104646100	Mavicyanin-like	None	2.797 (+)	none
LOC101266218	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 8-like	None	2.596 (+)	none
PsbT	Photosystem II subunit T (chloroplast) [<i>Suaeda japonica</i>]	1.393 (-)	2.571 (+)	1.931 (+)
LOC101247363	CASP 1	1.112 (-)	2.552 (+)	1.089 (+)
LOC101247786	Probable polyol transporter 6	None	2.548 (+)	9.344 (+)

LOC101267550	ABC transporter G family member 20-like	1.021 (-)	2.494 (+)	1.274 (+)
LOC101262584	CASP 2B1	1.906 (-)	2.489 (+)	2.400 (+)
LOC101262059	Proton-coupled amino acid transporter 3-like	1.340 (-)	2.346 (+)	1.100 (-)
LOC101266894	Probable aquaporin PIP2-8	8.088 (+)	2.344 (+)	1.189 (-)
LOC101251622	Inorganic phosphate transporter 1-4-like	1.102 (-)	2.178 (+)	2.002 (+)
LOC101252233	Probable aquaporin TIP4-3	2.501 (-)	2.157 (+)	1.260 (+)
Glb1	Non-symbiotic hemoglobin class 1	1.247 (-)	2.021 (+)	2.942 (+)
LOC101253759	MLO [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1.681 (-)	2.005 (+)	2.733 (+)
LOC101250538	Calcium-dependent kinase 20-like	11.909 (+)	1.965 (+)	2.867 (+)
LOC101244915	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 8-like	397.973 (+)	1.925 (+)	3.049 (+)

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

Tabela 8 – Genes com ‘**atividade de transdução de sinais**’ que foram regulados positivamente no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) exclusivamente no período **0DAI**.

ATIVIDADE DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
LOC101249831	Serine threonine- kinase ppk1 1-like	7.261 (+)*	1.261 (-)**	5.212 (+)
LOC101254919	Mitogen-activated kinase kinase kinase A-like	5.313 (+)	5.629 (+)	3.247 (+)
LOC101258387	Mitogen-activated kinase kinase kinase A-like	13.934 (+)	2.082 (-)	2.947 (+)
LOC101250742	Rapid alkalization fator	2.970 (+)	1.249 (+)	1.468 (+)
MKK2	Mitogen-activated kinase kinase 5-like	2.229 (+)	1.027 (+)	1.297 (+)
MKK4	Mitogen-activated kinase kinase 9	2.446 (+)	1.159 (-)	1.254 (+)
MAPK4	Mitogen-activated kinase homolog NTF6	2.174 (+)	1.127 (-)	1.146 (+)
LOC100301920	Phosphoinositide phospholipase C 4-like	2.486 (+)	1.308 (-)	1.112 (+)
LOC100301922	phosphoinositide phospholipase C 2-like isoform X1	2.024 (+)	1.514 (-)	1.059 (+)
LOC101263809	Mitogen-activated kinase kinase kinase YODA-like isoform X2	2.265 (+)	1.281 (-)	1.031 (+)
LOC101258902	Serine threonine- kinase BLUS1-like	8.863 (+)	None***	none
LOC101248763	Pollen receptor-like kinase 1	2.366 (+)	1.064 (-)	1.003 (-)
ETR4	Ethylene receptor 2-like	2.225 (+)	1.378 (-)	1.098 (-)
LOC101263486	LYK2	2.598 (+)	1.463 (-)	1.192 (-)
LOC101262567	NDR1 HIN1 12	2.485 (+)	1.357 (-)	1.206 (-)
LOC101266317	Receptor kinase	7.168 (+)	1.452 (-)	1.233 (-)
LOC101253938	Histidine-containing phosphotransfer 1-like	2.492 (+)	1.118 (-)	1.477 (-)
LOC101266899	Mitogen-activated kinase kinase kinase NPK1-like	27.937 (+)	18.746 (-)	1.503 (-)
LOC101250273	Mitogen-activated kinase kinase kinase NPK1-like	3.406 (+)	1.280 (-)	2.558 (-)
LOC101255217	Mitogen -activated kinase kinase kinase A-like	5.445 (+)	1.285 (-)	3.702 (-)
LOC101250705	Serine threonine- kinase ppk1 1-like	7.584 (+)	4.845 (+)	4.385 (-)
CRK1	Cysteine-rich receptor kinase 42	2.514 (+)	6.544 (-)	6.691 (-)
LOC101266471	Mitogen-activated kinase kinase kinase NPK1-like	28.600 (+)	30.129 (-)	7.279 (-)

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

Tabela 9 – Genes relacionados à ‘**fatores de transcrição e ligação a proteínas**’ que foram regulados positivamente no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) no período **0DAI**.

FATORES DE TRANSCRIÇÃO E LIGAÇÃO A PROTEÍNAS				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
LOC104649733	TIFY 5A-like [<i>Nicotiana tabacum</i>]	521.253 (+)*	None***	None
LOC101259898	BTB POZ and TAZ domain-containing 4-like	4.004 (+)	1.403 (+)	1.596 (+)
LOC101256950	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 18-like	2.924 (+)	4.039 (-)**	2.641 (-)
LOC101244360	TIFY 6B isoform X1	3.561 (+)	1.557 (-)	1.218 (-)
SRG1	TIFY 10B-like	10.431 (+)	1.440 (-)	1.112 (-)
LOC101247936	TIFY 10A-like	13.407 (+)	1.337 (-)	1.003 (+)
LOC101253212	TIFY 5A-like	342.416 (+)	1.319 (+)	4.503 (+)
LOC101252907	TIFY 5A-like	1945.882 (+)	5.343 (-)	5.343 (-)
LOC101252609	TIFY 5A-like	5186.983 (+)	none	None
LOC101261941	Transcription factor MYB1R1-like	4.696 (+)	none	None
LOC101260259	Dt1 [<i>Glycine max</i>]	3.777 (+)	76.798 (-)	3.896 (-)
LOC101257614	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 20a-like	3.394 (+)	none	None
LOC101247079	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 20a-like	3.597 (+)	none	None
Prg1	TIFY 10B-like [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7.176 (+)	1.392 (-)	1.148 (+)
LOC101253977	B-box zinc finger 22-like	2.737 (+)	1.536 (-)	1.759 (-)
LOC101263193	TIFY 10b-like	6.083 (+)	1.858 (-)	1.082 (-)

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

Tabela 10 – Genes relacionados com ‘**detoxificação celular**’ que foram regulados positivamente no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) no período **0DAI**.

DETOXIFICAÇÃO CELULAR				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
LOC101257228	Peroxidase 51-like	3.159 (+)*	1.038 (+)	1.302 (+)
LOC101266098	Peroxidase 66	2.421 (+)	1.553 (+)	1.350 (+)
LOC101258529	Peroxidase P7-like	3.142 (+)	1.655 (+)	1.052 (-)**
LOC101260517	Glutathione partial	9.364 (+)	none***	none
LOC101267810	Cationic peroxidase 1-like	3.083 (+)	None	15.907 (+)
LOC101247879	Peroxidase 5-like	3.036 (+)	None	none
SODCC.1	Superóxido dismutase	2.036 (+)	1.007	1.342

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

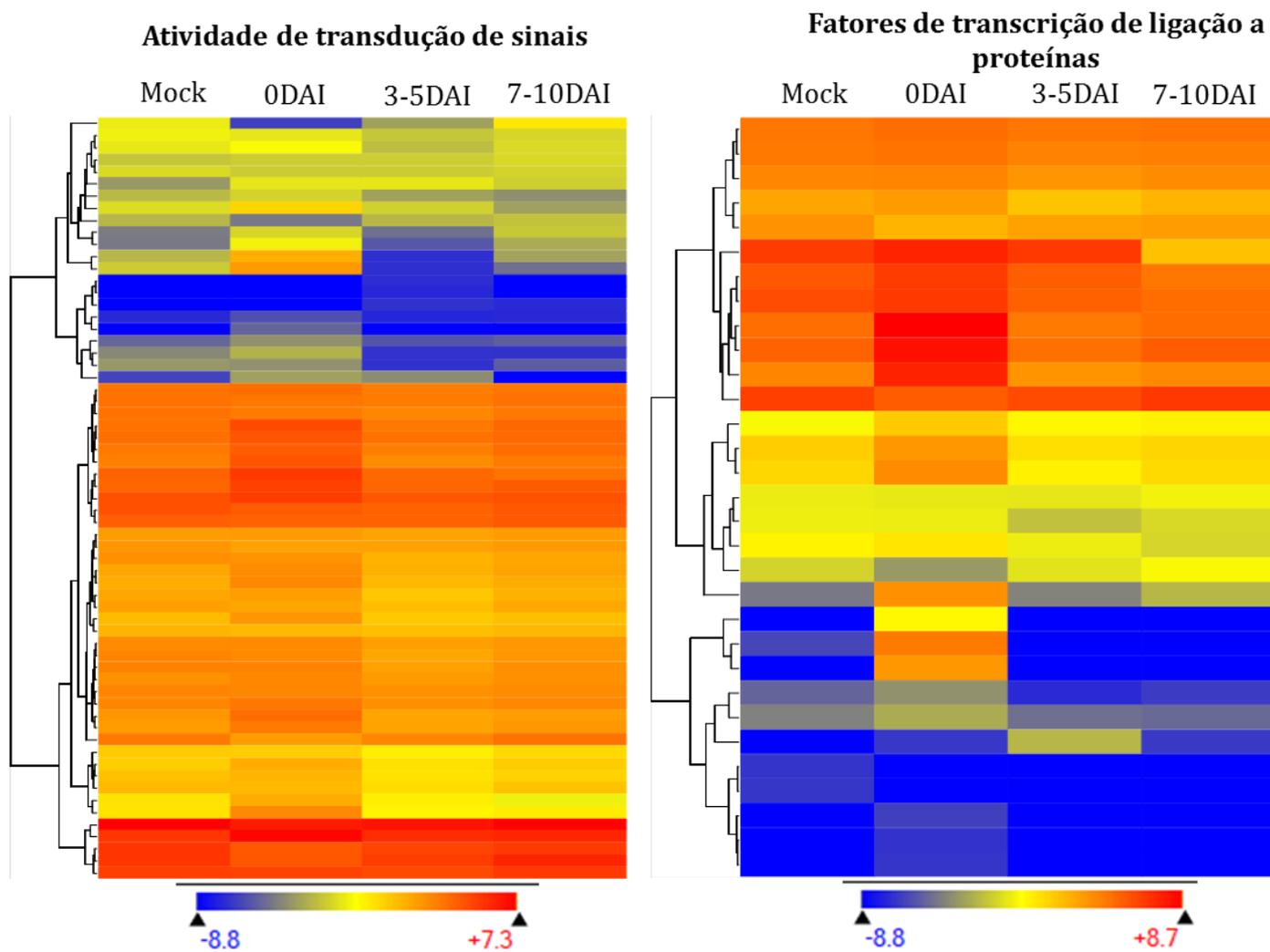


Figura 2 – Mapa de calor (*Heat map*) mostrando todos os genes expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) associados com atividade de transdução de sinais e fatores de transcrição de ligação a proteínas nos períodos avaliados e no controle *mock* inoculado.

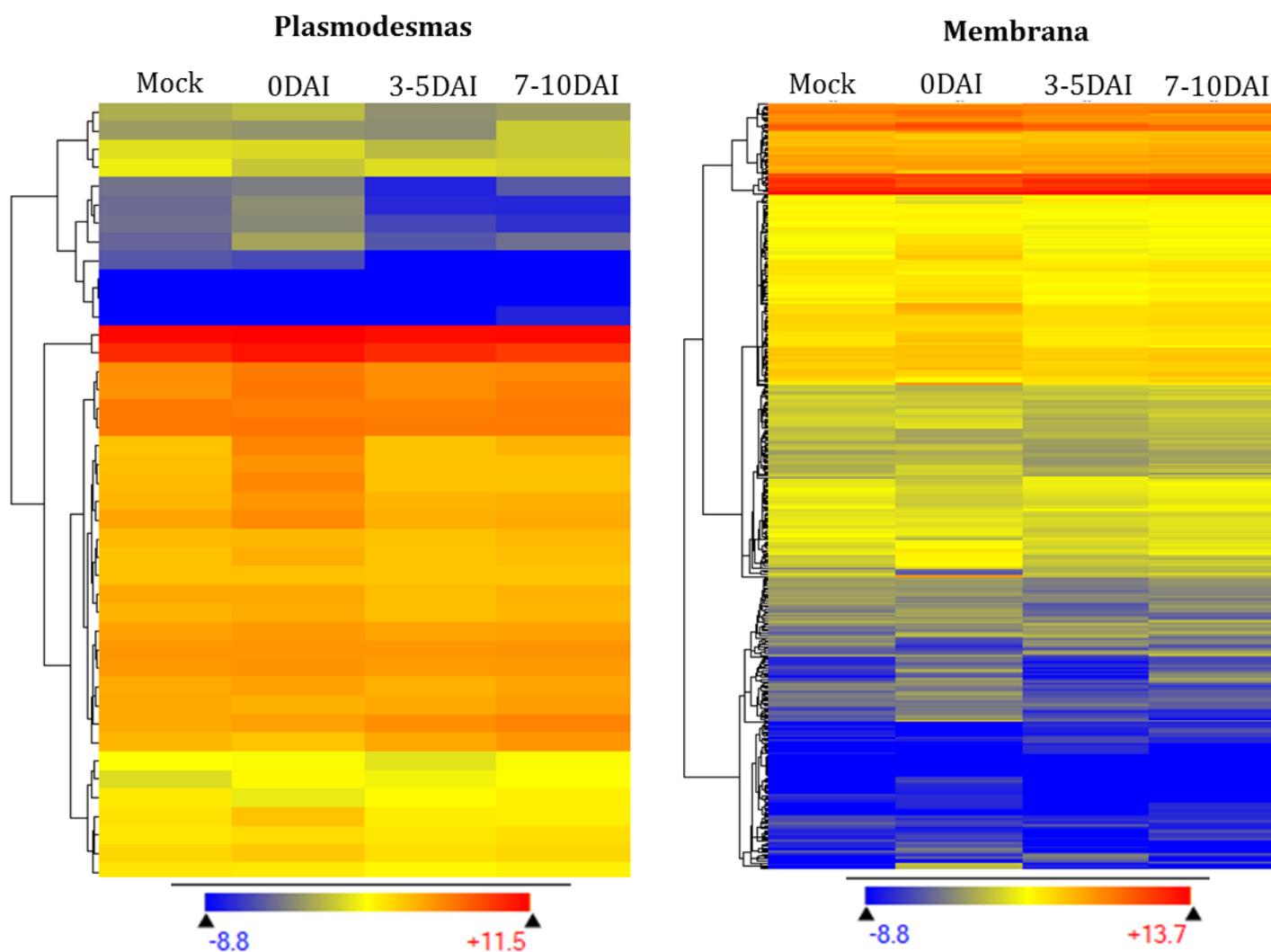


Figura 3 – Mapa de calor (*Heat map*) de todos os genes expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) anotados nas subcategorias de plasmodesmas e membranas considerando os três períodos avaliados e o controle *mock* inoculado.

Modificações transcricionais em funções relacionadas à patogênese viral – Os vírus como parasitas obrigatórios necessitam da maquinaria do hospedeiro para replicação de seus ácidos nucleicos, tradução e estabelecimento da patogênese, levando a uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas que resultam na expressão de sintomas. Neste contexto foi feita uma análise mais detalhada dos DEGs anotados na categoria de ‘componentes celulares’, bem como em outras categorias, visando identificar quais funções foram mais prejudicadas ou estimuladas durante a interação tomateiro – GRSV, baseando-se em estudos que reportaram a interferência de fatores do hospedeiro na infecção viral. Na subcategoria ‘organelas’ foi observado alterações no perfil de expressão gênica nos cloroplastos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi com o progresso da infecção. Essas mudanças foram caracterizadas pela redução no número DEGs e nos níveis de expressão gênica, onde o maior número de genes positivamente regulados foi observado no estágio inicial da infecção (0DAI).

Em cloroplastos 27 genes foram identificados e anotados como diferencialmente expressos no período 0DAI, dos quais 13 foram regulados positivamente e 14 regulados negativamente com relação ao controle *mock* inoculado. O **gene AOS** que codifica para enzima *allene oxide synthase 2*, foi diferencialmente expresso apenas no período 0DAI e apresentou maior nível de expressão quando comparado com outros genes expressos neste mesmo período. Os genes ***lap2*** e ***HSP21*** que codificam para as proteínas *leucine aminopeptidase chloroplastic* e *small heat shock chloroplastic*, respectivamente, foram também superexpressos apenas no período 0DAI. Dos 27 DEGs identificados na subcategoria cloroplastos, nenhum foi diferencialmente expresso no período 3-5DAI considerando a *fold change* ≥ 2 .

Um total de 39 e 43 DEGs foram anotados dentro das subcategorias ‘retículo endoplasmático’ e ‘complexo de Golgi’, respectivamente. Dos genes identificados como associados ao retículo endoplasmático 27 estavam positivamente regulados no período 0DAI,

seis genes foram positivos no período 3-5DAI e apenas quatro genes foram positivos aos 7-10DAI. Mostrando uma redução no número de genes expressos, no decorrer do processo infeccioso, bem como nos níveis de transcritos de genes associados ao retículo endoplasmático. Doze genes foram inibidos (negativos) em todos os períodos avaliados. O **gene *er-sHSP*** que codifica a proteína *kDa class IV heat shock* foi regulado positivamente nos períodos 0 e 3-5DAI, entretanto os maiores níveis foram observados nos períodos 0DAI. No período 7-10DAI ocorreu a inibição deste gene, o qual foi 22 vezes menos expresso com relação ao controle *mock* inoculado. Nos períodos 0DAI e 7-10DAI o gene LOC101267425 que codifica uma ***chaperone dnaJ chloroplastic-like*** foi duas vezes mais expresso com relação ao controle *mock* inoculado.

Com relação aos DEGs agrupados no complexo de Golgi, o maior número de genes regulados positivamente foi identificado no período 0DAI (27 genes). Ainda com relação a componentes celulares vários DEGs foram anotados nas categorias de constituintes dos ribossomos, biogênese de ribossomos, processos metabólicos de compostos nitrogenados, atividade oxirredutase, lipídios, peroxissomos, lisossomos, respostas a estímulos endógenos, ubiquitinação e fotossíntese (visualizada pelas alterações em componentes dos cloroplastos, tilacóides e nos níveis de clorofila), enfatizando o importante papel dessas funções na interação tomateiro – GRSV. De modo geral os DEGs que codificam para estas funções apresentaram maiores níveis de expressão durante o estágio inicial da infecção viral (0DAI).

Com relação às ubiquitinas o gene **LOC104644463** que codifica para *F-box At3g07870-like* foi expresso em altos níveis apenas nos períodos 0DAI (24.455 *up*) e 7-10DAI (21.682). Em adição, o gene **LOC101246898** que codifica para *E3 ubiquitin- ligase RBBP6-like* foi encontrado regulado positivamente em todos os períodos avaliados 0DAI (5.433) 3-5DAI (13.569) e 7-10DAI (17.501).

Muitos vírus de plantas interagem com fatores de iniciação e alongação da tradução eucariótica (eIF4F) para a tradução de suas proteínas. Neste trabalho de interação compatível foi identificado o gene **LOC101254068** que codifica para o fator de iniciação da tradução EiF1AD, com altos níveis de expressão apenas aos 7-10DAI. Além disso, foi identificado o gene **LOC101261616** que codifica para *Elongation factor 4* com altos níveis de expresso nos períodos 0DAI e 3-5DAI. O perfil dos genes positivos e negativos relacionados com algumas dessas funções está descrito nas tabelas abaixo (**Tabelas 11–15**).

Tabela 11 – Genes associados com fatores relacionados à ‘**fotossíntese (cloroplastos, tilacóides e fotossistema I e II)**’ que foram diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

CLOROPLASTOS				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
AOS	Allene oxide synthase 2	172.138 (+)*	1.189 (-)**	1.267 (-)
lap2	Leucine aminopeptidase chloroplastic	58.770 (+)	1.025 (+)	1.008 (+)
Aoc	Allene oxide cyclase	12.736 (+)	1.057 (-)	1.192 (+)
HSP21	Small heat shock chloroplastic	7.616 (+)	1.660 (+)	2.835 (-)
LOC101262362	Thioredoxin chloroplastic	4.695 (+)	1.809 (-)	1.513 (-)
LOC104646166	Ribonuclease J-like	4.198 (+)	1.275 (-)	2.169 (+)
LOC104648867	Photosystem I reaction center subunit chloroplastic-like	4.047 (+)	1.101 (-)	4.962 (+)
LOC101262947	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101262947	3.771 (+)	None***	14.288 (+)
LOC101265380	Chaperone partial	3.616 (+)	1.575 (-)	1.386 (-)
AOS	Allene oxide synthase 2	2.676 (+)	1.297 (-)	1.115 (+)
rpl20	Ribosomal L20 (chloroplast)	2.543 (+)	1.577 (-)	5.354 (+)
LOC101244637	Lipid phosphate phosphatase epsilon chloroplastic-like	2.527 (+)	1.108 (+)	1.047 (-)
LOC101247689	UPF0301 CHU_1773	2.434 (+)	1.044 (-)	2.037 (+)
LOC101252045	UPF0301 TC_0483 isoform X1	2.072 (-)	1.342 (-)	1.255 (-)
LOC101259906	2-succinylbenzoate-- chloroplastic peroxisomal	2.120 (-)	1.959 (-)	1.011 (-)
trnK-UUU	---NA---	2.510 (-)	1.016 (-)	2.650 (-)
LOC101264997	Ribosomal partial (mitochondrion)	2.559 (-)	1.053 (+)	1.274 (+)
Cbl	Calcineurin B 7 isoform X4 [<i>Daucus carota sativus</i>]	2.591 (-)	1.134 (-)	1.376 (+)
rpl32	Ribosomal L32 (chloroplast) [<i>S. lycopersicum</i>]	2.601 (-)	3.150 (-)	1.835 (-)
trnK-UUU	---NA---	2.738 (-)	1.077 (-)	1.994 (-)
sig1	Self-pruning interacting 1	3.969 (-)	1.473 (+)	2.513 (+)
LOC104645973	Late embryogenesis abundant	4.388 (-)	1.116 (-)	1.288 (+)
LOC101265790	AAA+ ATPase domain-containing	4.394 (-)	1.363 (-)	1.231 (-)
rps15	Ribosomal S15 (chloroplast) [<i>S. lycopersicum</i>]	9.631 (-)	1.093 (+)	1.184 (-)
rps19	Ribosomal S19 (chloroplast) [<i>Coffea arabica</i>]	10.935 (-)	2.774 (-)	1.209 (-)
rpl33	Ribosomal L33 (chloroplast) [<i>Panax ginseng</i>]	18.271 (-)	1.971 (-)	1.666 (-)
LOC101254173	Ribosomal L16 (mitochondrion)	102.505 (-)	1.110 (+)	3.423 (-)

TILACÓIDES

Código do Gene	Produto gênico	Fold Change		
		0DAI	3-5DAI	7-10DAI
AOS	Allene oxide synthase 2	172.138 (+)	1.189 (-)	1.267 (-)
ChrC	Plastid lipid associated CHRC	3.375 (+)	1.200 (+)	1.909 (-)
AOS	Allene oxide synthase 2	2.676 (+)	1.297 (-)	1.115 (+)
LOC101251845	Ferredoxin-NADP partial	2.419 (+)	1.223 (-)	2.393 (-)
LOC543976	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	2.449 (-)	1.020 (+)	1.631 (+)
LOC101265605	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	2.525 (-)	1.083 (-)	1.227 (+)
LOC104645884	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	2.589 (-)	1.002 (-)	1.320 (+)
LOC101266182	Chlorophyll a-b binding chloroplastic-like	2.634 (-)	1.046 (+)	1.452 (+)
LOC101246826	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase chloroplastic	2.661 (-)	1.076 (-)	3.135 (+)
ndhG	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 6 (chloroplast) [<i>S. lycopersicum</i>]	2.941 (-)	1.312 (+)	1.325 (+)
LOC101265886	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	3.084 (-)	1.002 (+)	1.450 (+)
LOC101259359	Photosystem I assembly ycf4 (chloroplast) [<i>S. lycopersicum</i>]	3.335 (+)	1.679 (+)	1.332 (-)
ChrC	Plastid lipid associated CHRC	3.375 (+)	1.200 (+)	1.909 (-)
LOC101251845	Ferredoxin-NADP partial	2.419 (+)	1.223 (-)	2.393 (-)
LOC543976	chlorophyll a-b binding chloroplastic	2.449 (-)	1.020 (+)	1.631 (+)
LOC101265605	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase chloroplastic	2.661 (-)	1.076 (-)	3.135 (+)
LOC104645884	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 6 (chloroplast) [<i>S. lycopersicum</i>]	2.941 (-)	1.312 (+)	1.325 (+)
LOC101266182	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	3.084 (-)	1.002 (+)	1.450 (+)
LOC101246826	Photosystem I assembly ycf4 (chloroplast) [<i>S. lycopersicum</i>]	3.335 (-)	1.679 (+)	1.332 (-)

FOTOSSISTEMA I e II

Código do gene	Produto gênico	Fold Change		
		0DAI	3-5DAI	7-10DAI
LOC543976	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	2.449 (-)	1.020 (+)	1.631 (+)
LOC101265605	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	2.525 (-)	1.083 (-)	1.227 (+)
LOC104645884	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	2.589 (-)	1.002 (-)	1.320 (+)
LOC101266182	Chlorophyll a-b binding chloroplastic-like	2.634 (-)	1.046 (+)	1.452 (+)
LOC101265886	Chlorophyll a-b binding chloroplastic	3.084 (-)	1.002 (+)	1.450 (+)
LOC101259359	Photosystem I assembly ycf4 (chloroplast)	3.335 (-)	1.679 (+)	1.332 (-)
PsaI	Photosystem I subunit VIII (chloroplast)	4.347 (-)	1.049 (+)	1.126 (+)

psbA	PSII 32 KDa (chloroplast)	4.238 (-)	1.838 (+)	1.550 (+)
psbM	Photosystem II M (chloroplast)	1.007 (+)	3.659 (-)	5.964 (-)
psbD	Photosystem II D2 (chloroplast)	1.997 (-)	2.523 (+)	1.660 (+)
PsbC	photosystem II CP43 chlorophyll partial (chloroplast)	2.384 (-)	2.254 (+)	1.508 (+)
PsaA	Photosystem I P700 apo A1 (chloroplast)	2.454 (-)	2.505 (+)	1.463 (+)
ycf3	Hypothetical chloroplast RF34 (chloroplast)	2.167 (-)	1.322 (+)	1.263 (-)
PsaI	Photosystem I subunit VIII (chloroplast)	4.347 (-)	1.049 (+)	1.126 (+)
ycf4	Photosystem I assembly ycf4 (chloroplast)	2.245 (-)	1.943 (+)	1.265 (-)
PsbB	Photosystem II CP47 reaction center -like	2.665 (-)	1.852 (+)	1.550 (+)
PsbT	Photosystem II subunit T (chloroplast)	1.393 (-)	2.571 (+)	1.931 (+)
psbN	Photosystem II N (chloroplast)	3.247 (-)	2.331 (+)	1.318 (+)
psbH	Photosystem II phospho (chloroplast)	3.282 (-)	1.303 (+)	1.134 (+)
PsaC	PSI 9KDa (chloroplast)	3.031 (-)	1.467 (+)	1.422 (+)
LOC101259359	Photosystem I assembly ycf4 (chloroplast)	3.335 (-)	1.679 (+)	1.332 (-)
LOC101255525	Photosystem II 5 kDa chloroplastic-like	2.487 (+)	2.550 (+)	1.297 (+)
LOC101251369	Photosystem I P700 apo A1 (mitochondrion)	1.362 (+)	2.101 (-)	1.430 (-)
LOC101254188	Photosystem I subunit IX (chloroplast)	2.872 (+)	4.135 (-)	1.019 (-)
PSBP		1.089 (-)	1.024 (-)	1.168 (+)
LOC104648867	Photosystem I reaction center subunit chloroplastic-like	4.047 (+)	1.101 (-)	4.151 (+)
LOC104648991	Photosystem I reaction center subunit chloroplastic-like	2.175 (+)	1.673 (-)	1.015 (+)
LOC101252753	Photosystem II 10 kDa chloroplastic-like	6.872 (+)	1.290 (+)	3.530 (-)

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

Tabela 12 – Total de genes na subcategoria ‘retículo endoplasmático’ que foram diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
er-sHSP	kDa class IV heat shock	35.393 (+)*	6.653 (+)	22.051 (-)**
LOC101254876	Uncharacterized protein LOC101254876	25.874 (+)	2.632 (+)	4.203 (+)
PIN2	Auxin efflux carrier component 2	9.886 (+)	None***	none
LOC101244079	Disulfide-isomerase-like	8.705 (+)	1.237 (+)	1.001 (-)
LOC101261717	Disulfide isomerase-like 1-4	4.316 (+)	2.464 (+)	12.213 (+)
LOC101250189	B-cell receptor-associated 31-like	4.137 (+)	1.126 (-)	1.220 (-)
PIN8	Auxin efflux carrier component 5	3.754 (+)	2.991 (+)	6.634 (+)
LOC101264276	4-coumarate-- ligase-like 1	3.626 (+)	19.039 (-)	1.208 (+)
LOC101264650	Phosphatidate cytidyltransferase 1-like [<i>Erythranthe guttata</i>]	3.293 (+)	6.836 (+)	13.537 (+)
LOC101246823	Stress-associated endoplasmic reticulum 2-like	3.008 (+)	1.127 (-)	1.336 (-)
LOC101252644	Geraniol 8-hydroxylase-like	2.982 (+)	1.458 (-)	1.943 (+)
LOC101265424	MIZU-KUSSEI 1-like	2.881 (+)	1.128 (-)	1.190 (-)
LOC101255302	ER lumen-retaining receptor	2.859 (+)	1.075 (-)	1.065 (+)
LOC101255462	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101255462	2.673 (+)	None	none
LOC101262921	Disulfide-isomerase-like	2.580 (+)	1.111 (-)	1.203 (-)
LOC101251998	ER lumen -retaining receptor [Brassica oleracea oleracea]	2.555 (+)	2.570 (+)	8.018 (-)
LOC101264861	UDP-galactose UDP-glucose transporter 4-like isoform X2	2.391 (+)	1.350 (-)	1.067 (+)
LOC101248763	Pollen receptor-like kinase 1	2.366 (+)	1.064 (-)	1.003 (-)
LOC101262322	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase MNS1-like	2.331 (+)	1.813 (-)	1.464 (-)
SAR2	GTP-binding SAR1A-like	2.269 (+)	1.265 (-)	1.263 (-)
ETR4	Ethylene receptor 2-like	2.225 (+)	1.378 (-)	1.098 (-)
LOC101258207	B-cell receptor-associated 31-like	2.203 (+)	1.096 (-)	1.013 (-)
CNX61.0	Calnexin homolog 1-like	2.161 (+)	1.055 (-)	1.550 (-)
LOC101250311	Uncharacterized membrane At4g09580-like	2.126 (+)	1.161 (-)	1.089 (-)
LOC101262222	Disulfide-isomerase-like	2.110 (+)	1.343 (-)	1.029 (-)
LOC101247033	Calnexin homolog 1-like	2.083 (+)	1.323 (-)	1.000 (-)
LOC101246092	Cytochrome P450 98A2-like	2.017 (+)	1.321 (-)	1.329 (-)

LOC101245125	SPX domain-containing 4	2.098 (-)	1.856 (-)	1.455 (-)
LOC101264518	CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase 1-like	2.176 (-)	1.462 (-)	1.084 (-)
LOC101257066	STRICTOSIDINE SYNTHASE-LIKE 10-like	2.446 (-)	1.373 (-)	1.220 (-)
Ail	SPX domain-containing 1-like	2.555 (-)	1.575 (-)	1.455 (-)
LOC101257836	SPX domain-containing 1-like	2.718 (-)	1.681 (-)	1.386 (-)
PIN5	Auxin efflux carrier component 8	3.073 (-)	3.103 (-)	1.702 (-)
LOC101267398	<i>Erwinia</i> induced 2	4.221 (-)	1.063 (-)	5.045 (-)
LOC104644342	Synaptotagmin-5-like	5.281 (-)	5.281 (-)	6.312 (-)
LOC101249781	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 1-like [<i>S. lycopersicum</i>]	6.391 (-)	3.761 (-)	2.290 (-)
LOC101244416	SPX domain-containing 3	8.450 (-)	1.902 (-)	2.383 (-)
LOC104646497	GPI mannosyltransferase 3	10.892 (-)	10.211 (-)	16.560 (-)
LOC101252161	ECERIFERUM 1	39.635 (-)	1.842 (-)	1.439 (+)

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

Tabela 13 – Genes diferencialmente expressos associados com o ‘complexo de Golgi’ que foram diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

COMPLEXO DE GOLGI				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
LOC101265190	Probable galacturonosyltransferase-like 10	28.347 (+)*	2.158 (+)	2.247 (+)
LOC101256176	Methyltransferase DDB_G0268948	14.805 (+)	1.032 (-)**	1.071 (-)
LOC101259809	Trichome birefringence-like 19	9.980 (+)	None***	none
LOC101251208	Probable methyltransferase PMT20	3.751 (+)	1.131 (-)	1.052 (-)
LOC104647398	DNA RNA polymerases superfamily	3.534 (+)	4.599 (+)	1.003 (+)
LOC101247643	Beta-1,3-galactosyltransferase 7	3.462 (+)	1.079 (+)	1.228 (+)
LOC101248701	ALTERED XYLOGLUCAN 4	3.219 (+)	2.203 (+)	2.505 (-)
LOC101268678	DETOXIFICATION 48	2.969 (+)	1.254 (-)	1.303 (+)
LOC101248561	coatomer subunit beta -3 isoform X1	2.962 (+)	1.046 (+)	1.518 (-)
Rab1A	GTP-binding YPTM2	2.921 (+)	1.038 (-)	1.056 (-)
LOC101247369	UDP-glucuronate 4-epimerase 6-like	2.746 (+)	1.028 (-)	1.396 (+)
LOC101257558	Probable pectin methyltransferase QUA2	2.630 (+)	1.020 (+)	1.283 (+)
LOC101245295	Trichome birefringence-like 39	2.625 (+)	1.114 (-)	2.209 (+)
LOC101247727	Hydroxyproline O-galactosyltransferase GALT6-like	2.547 (+)	1.071 (-)	1.192 (-)
LOC544298	Glutaredoxin	2.431 (+)	1.017 (-)	1.088 (-)
LOC101260112	alpha-1,4-glucan- synthase [UDP-forming] 1-like	2.428 (+)	4.127 (+)	2.919 (+)
LOC101247911	Probable galacturonosyltransferase-like 1	2.423 (+)	1.231 (+)	1.530 (+)
LOC101264861	UDP-galactose UDP-glucose transporter 4-like isoform X2	2.391 (+)	1.350 (-)	1.067 (+)
LOC101265541	Probable methyltransferase PMT2	2.384 (+)	1.016 (-)	1.019 (+)
LOC101262322	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase MNS1-like	2.331 (+)	1.813 (-)	1.464 (-)
SAR2	GTP-binding SAR1A-like	2.269 (+)	1.265 (-)	1.263 (-)
LOC101261913	Trichome birefringence-like 7	2.172 (+)	1.030 (+)	1.135 (+)
LOC101247523	Glycosyltransferase family 92 RCOM_0530710	2.131 (+)	1.089 (-)	1.157 (+)
LOC101267826	Trichome birefringence-like 42	2.130 (+)	None	2.705 (+)
LOC101255401	Ras-related RABH1e	2.103 (+)	1.278 (+)	1.330 (+)
LOC101255657	Trichome birefringence-like 19	2.099 (+)	1.100 (-)	1.033 (+)
LOC101247486	Copper transporter 5	2.058 (+)	1.127 (+)	1.677 (+)
LOC101253745	ER lumen-retaining receptor A isoform X2	2.013 (+)	1.597 (-)	1.247 (-)
LOC101265374	Trichome birefringence-like 42	1.862 (+)	3.076 (-)	3.677 (-)
LOC101267553	Trichome birefringence-like 4	2.226 (-)	1.076 (-)	2.660 (-)

LOC100736441	RD-22 like partial	2.419 (-)	1.005 (+)	1.261 (+)
LOC101254673	Trichome birefringence-like 33	2.422 (-)	1.376 (-)	1.078 (-)
LOC101247637	Trichome birefringence-like 41	2.666 (-)	1.036 (-)	1.567 (+)
LOC101256919	Phosphate transporter PHO1	2.767 (-)	1.585 (-)	1.090 (-)
LOC101245719	Probable phospholipid-transporting ATPase 4	2.772 (-)	3.487 (-)	1.497 (-)
LOC101266460	Probable galacturonosyltransferase-like 7	2.969 (-)	1.691 (-)	1.210 (+)
LOC101252304	Trichome birefringence-like 43	3.247 (-)	3.078 (-)	8.716 (-)
LOC101260790	Probable beta-1,3-galactosyltransferase 8	3.254 (-)	1.063 (-)	5.239 (-)
LOC101268733	Trichome birefringence-like 34	3.342 (-)	3.342 (-)	3.045 (+)
LOC101055573	Probable sucrose-phosphate synthase 2	3.358 (-)	1.443 (-)	1.197 (-)
LOC101244522	Trichome birefringence-like 41	3.588 (-)	3.588 (-)	4.289 (-)
LOC101258234	Trichome birefringence-like 19	4.060 (-)	1.935 (-)	1.162 (-)
LOC101251041	Trichome birefringence-like 25	12.125 (-)	1.728 (-)	1.457 (-)
LOC101251942	Alpha-1,4-glucon- synthase [UDP-forming] 1-like	14.864 (-)	2.952 (-)	2.543 (-)

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

Tabela 14 – Genes anotados na subcategoria de ‘**peroxissomos**’ que foram diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

PEROXISSOMOS				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
LOC101268564	LRR receptor-like serine threonine- kinase RPK2	51.834 (+)*	None***	none
LOC101263761	Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1	6.805 (+)	1.222 (-)**	1.131 (+)
opr3	12-oxophytodienoate reductase 3	6.079 (+)	1.048 (-)	1.100 (+)
LOC101254597	Probable acyl-activating enzyme peroxisomal	4.626 (+)	1.278 (-)	1.218 (-)
LOC101263375	Meiosis arrest female 1-like	3.024 (+)	4.439 (-)	1.595 (-)
LOC101250354	Acyl-coenzyme A oxidase peroxisomal-like [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2.403 (+)	1.208 (-)	1.171 (+)
LOC101259906	2-succinylbenzoate-- chloroplastic peroxisomal	2.120 (-)	1.959 (-)	1.011 (-)
LOC101266519	Internal alternative NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductase mitochondrial-like	2.332 (-)	1.404 (-)	1.005 (-)

* Genes regulados positivamente (+). Em cinza os genes regulados positivamente considerando a *fold change* ≥ 2 .

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

Genes diferencialmente expressos envolvidos com vias de sinalização de respostas de

defesa – Verificou-se que genes relacionados com a sinalização de respostas de defesa em plantas também tiveram seu perfil transcricional afetado em resposta da cultivar de tomateiro suscetível à infecção por GRSV. Com relação aos genes relacionados com a via de sinalização do ácido salicílico, dentre nove DEGs identificados, apenas dois foram regulados positivamente nos períodos 0DAI e 3-5DAI e apenas um gene foi positivo aos 7-10DAI. Dos DEGs identificados como envolvidos no metabolismo e resposta ao etileno 63 foram regulados positivamente no período 0DAI, nove positivos aos 3-5DAI e 17 genes aos 7-10DAI. Sete genes relacionados com o ácido jasmônico apresentaram expressão diferencial com relação ao controle *mock* inoculado apenas no período 0DAI, nos demais períodos (3-5DAI e 7-10DAI) estes genes foram regulados negativamente ou não diferiram do controle

mock inoculado. Além disso, foram identificados DEGs envolvidos com respostas mediadas por auxinas e ácido absísico, em que o maior número de genes positivos foi visualizado no período 0DAI.

Tabela 15 – Genes associados com ‘vias de sinalização de resposta de defesa em plantas’ que foram diferencialmente expressos no tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) inoculado com um isolado de *Groundnut ringspot virus* (GRSV).

ÁCIDO JASMÔNICO				
Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
LOC101262663	Jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like	14.401 (+)*	5.612 (-)**	1.369 (+)
LOC101250455	Jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like isoform X4 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	9.487 (+)	3.104 (-)	1.490 (+)
JA2	NAC domain-containing 72-like	7.932 (+)	1.108 (+)	1.032 (+)
LOC101262053	Jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like	6.161 (+)	1.645 (-)	1.107 (-)
LOC101262357	Jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like	6.070 (+)	1.944 (-)	1.102 (-)
LOC101258495	Jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like	2.208 (+)	1.337 (-)	1.512 (+)
LOC101258277	Jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like	2.462 (-)	1.985 (-)	1.751 (+)
ÁCIDO SALICÍLICO				
Código do Gene	Produto gênico	Fold Change		
		0DAI	3-5DAI	7-10DAI
LOC101256808	Salicylate carboxymethyltransferase-like	8.736 (+)	5.738 (-)	1.607 (-)
LOC101257111	Salicylate carboxymethyltransferase-like	2.955 (+)	2.835 (+)	None
NIM1	...	1.376 (+)	1.269 (-)	1.054 (+)
LOC101265080	Salicylic acid-binding 2-like	None***	4.404 (+)	3.283 (+)
SAMT	...	1.168 (-)	1.000 (-)	1.470 (+)
LOC101265379	Salicylic acid-binding 2-like	1.340 (-)	4.167 (-)	4.167 (-)
LOC101259194	Salicylate carboxymethyltransferase-like	1.427 (-)	2.917 (-)	2.339 (-)
LOC101258646	Salicylate carboxymethyltransferase-like	2.090 (-)	2.242 (-)	1.211 (-)
LOC101260023	Salicylate carboxymethyltransferase-like	9.639 (-)	34.417 (-)	2.664 (-)
ÁCIDO ABSCÍLICO				
Código do gene	Produto gênico	Fold Change		
		0DAI	3-5DAI	7-10DAI
LOC101254720	Abscisic acid 8-hydroxylase 1-like	26.430 (+)	2.746 (-)	2.553 (-)

LOC101248072	Abscisic acid and environmental stress-inducible TAS14-like	9.216 (+)	3.711 (+)	38.532 (-)
LOC104645416	Abscisic acid 8-hydroxylase 4	8.619 (+)	9.594 (-)	1.087 (-)
LOC101258963	Abscisic acid receptor PYL4-like	3.575 (+)	1.327 (+)	2.377 (+)
LOC101261414	Abscisic acid receptor PYL4-like	3.437 (+)	None	3.604 (+)
LOC101268417	Abscisic acid receptor PYR1-like	1.621 (+)	1.406 (+)	2.782 (+)
LOC101249565	Abscisic acid 8-hydroxylase 1-like	1.513 (+)	1.350 (-)	2.094 (+)
LOC101245998	Abscisic acid receptor PYL4-like	1.051 (+)	1.052 (+)	2.051 (+)
LOC104645743	Abscisic acid 8-hydroxylase 3-like	1.598 (-)	8.782 (-)	1.199 (+)
LOC101263741	Abscisic acid receptor PYL4-like	3.194 (-)	1.609 (-)	5.223 (-)
LOC101263406	Abscisic acid 8-hydroxylase 3-like	3.282 (-)	1.323 (-)	1.385 (+)
LOC101266289	Abscisic acid 8-hydroxylase 3-like	3.334 (-)	1.800 (-)	1.672 (+)
AO3	Abscisic-aldehyde oxidase-like	3.587 (-)	2.479 (-)	2.313 (-)

ETILENO

Código do gene	Produto gênico	Fold change		
		0DAI	3-5DAI	7-10 DAI
LOC101246841	Ethylene-responsive transcription factor ERF017-like	840.956 (+)	3.940 (-)	1.014 (-)
LOC101252357	Ethylene-responsive transcription factor ERF071-like	826.242 (+)	1.421 (-)	1.264 (-)
LOC101246484	Ethylene-responsive transcription factor ERF109-like	696.110 (+)	11.513 (-)	1.150 (-)
LOC101253257	Ethylene-responsive transcription factor ERF017-like	653.342 (+)	3.211 (+)	11.931 (+)
LOC101268766	Ethylene-responsive transcription factor erf017	555.911 (+)	None	None
LOC101267746	Ethylene-responsive transcription factor ERF109-like	482.956 (+)	3.973 (-)	9.743 (+)
LOC101260455	Ethylene-responsive transcription factor ERF027-like	380.603 (+)	1.116 (+)	3.657 (-)
LOC101249870	Ethylene-responsive transcription factor 13-like	155.531 (+)	3.989 (-)	3.989 (-)
LOC101263697	Ethylene-responsive transcription factor ABR1-like	130.368 (+)	20.174 (-)	2.085 (-)
LOC101251748	Ethylene-responsive transcription factor ERF109-like	115.793 (+)	None	None
LOC101251084	Ethylene-responsive transcription factor ABR1-like isoform X2	96.100 (+)	2.201 (-)	9.233 (-)
LOC101252051	Ethylene-responsive transcription factor ERF109-like	81.424 (+)	None	None
LOC101267832	Ethylene-responsive transcription factor 2-like	56.968 (+)	None	None
LOC101264530	Ethylene-responsive transcription factor ERF114-	38.585 (+)	1.063 (-)	1.272 (+)

	like			
LOC101243961	Ethylene-responsive transcription factor ERF098-like	36.906 (+)	12.171 (-)	12.171 (-)
LOC101256610	Ethylene-responsive transcription factor 2-like	21.499 (+)	None	3.719 (+)
LOC101266612	Ethylene-responsive transcription factor ABR1-like isoform X2	20.844 (+)	2.144 (-)	1.804 (-)
LOC101263899	Ethylene-responsive transcription factor ABR1-like	18.913 (+)	1.708 (-)	1.502 (-)
LOC101266387	Ethylene-responsive transcription factor ERF021-like	14.351 (+)	None	None
LOC101245636	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-11-like	14.252 (+)	None	None
ER5	Desiccation protectant Lea14 homolog	14.141 (+)	2.711 (-)	7.408 (-)
LOC104648057	AP2-like ethylene-responsive transcription factor At1g16060	14.085 (+)	1.075 (+)	4.072 (-)
LOC101245414	Ethylene-responsive transcription factor ERF024-like	12.657 (+)	None	None
LOC101248770	Ethylene-responsive transcription factor ERF010-like	11.511 (+)	1.239 (-)	1.003 (+)
LOC544260	Ethylene-responsive transcription factor 4-like	11.041 (+)	1.051 (-)	2.160 (+)
LOC101264356	AP2-like ethylene-responsive transcription factor At1g16060	7.987 (+)	2.751 (+)	None
LOC101244085	Ethylene-responsive transcription factor CRF4-like	7.465 (+)	1.446 (-)	1.009 (-)
LOC100736472	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-7-like isoform X2	7.266 (+)	1.797 (-)	1.204 (-)
LOC101249592	Ethylene-responsive transcription factor 13-like	7.249 (+)	3.699 (-)	3.639 (+)
LOC104648964	Ethylene-responsive transcription factor 2-like	7.053 (+)	10.020 (+)	None
LOC101256347	Ethylene-responsive transcription factor ERF022-like	5.556 (+)	4.042 (-)	4.042 (-)
LOC544041	Ethylene-responsive transcription factor 1	5.527 (+)	1.359 (-)	1.466 (+)
LOC101268109	Ethylene-responsive transcription factor ERF025-like	5.391 (+)	27.137 (-)	6.645 (+)
LOC104646568	Ethylene-responsive transcription factor ERF114-like	5.387 (+)	6.765 (-)	7.578 (-)
LOC101257992	Ethylene-responsive transcription factor ERF061	5.247 (+)	1.323 (-)	1.102 (-)
LOC101257505	Ethylene-responsive transcription factor ERF020-like	4.982 (+)	1.623 (+)	4.501 (-)
LOC101264838	Ethylene-responsive transcription factor ERF054-like	4.877 (+)	1.196 (-)	1.281 (-)
LOC101254274	Ethylene-responsive transcription factor CRF4-like	4.875 (+)	1.820 (+)	2.619 (+)
LOC101249381	Ethylene-responsive transcription factor 4-like	4.462 (+)	1.139 (-)	1.314 (+)

LOC101247461	Ethylene-responsive transcription factor 1B	4.039 (+)	None	None
LOC101261069	Ethylene-responsive transcription factor ERF098-like	4.036 (+)	3.777 (+)	4.059 (+)
LOC101267589	Ethylene-responsive transcription factor 1	3.691 (+)	1.317 (-)	1.003 (-)
LOC101260767	Ethylene-responsive transcription factor ERF096	3.661 (+)	2.154 (-)	1.654 (-)
LOC104647416	Ethylene-responsive transcription factor CRF2	3.646 (+)	1.183 (+)	9.364 (+)
ERF2	Ethylene-responsive transcription factor ERF071-like	3.629 (+)	1.171 (-)	1.051 (-)
LOC104644715	Ethylene-responsive transcription factor LEP-like	3.382 (+)	None	None
DREB3	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-4-like	3.337 (+)	1.387 (-)	1.007 (-)
LOC101249309	Ethylene-responsive transcription factor 3-like	3.225 (+)	1.038 (-)	1.013 (+)
LOC101255411	AP2-like ethylene-responsive transcription factor At1g16060	3.001 (+)	2.204 (-)	1.059 (-)
LOC101266802	Ethylene-responsive transcription factor ERF113-like	2.740 (+)	8.061 (-)	34.261 (-)
LOC101250863	Ethylene-responsive transcription factor ERF091	2.600 (+)	None	3.386 (+)
LOC101259843	AP2-like ethylene-responsive transcription factor AIL6	2.571 (+)	3.276 (-)	2.688 (-)
LOC101251371	AP2-like ethylene-responsive transcription factor AIL1	2.487 (+)	1.854 (-)	2.276 (-)
LOC101246746	Ethylene-responsive transcription factor ERF027-like	2.449 (+)	7.315 (-)	2.034 (+)
JERF1	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-12-like	2.421 (+)	1.121 (+)	1.734 (+)
DREB2	Ethylene-responsive transcription factor TINY-like	2.398 (+)	1.008 (+)	1.127 (+)
LOC101247159	Ethylene-responsive transcription factor ERF098-like	2.368 (+)	1.355 (-)	5.078 (-)
LOC101257043	Ethylene-responsive transcription factor 4-like	2.358 (+)	2.614 (-)	1.025 (-)
ERF1	Ethylene-responsive transcription factor 1B-like	2.255 (+)	1.318 (-)	1.256 (+)
LOC100736535	AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3 isoform X1	2.123 (+)	1.494 (-)	2.022 (-)
LOC101250096	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-4-like	2.118 (+)	1.283 (-)	1.443 (+)
LOC101268529	Ethylene-responsive transcription factor ERF011-like	2.072 (+)	1.204 (-)	1.034 (-)
LOC101264209	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-13-like	2.020 (+)	1.222 (-)	1.100 (-)

* Genes regulados positivamente (+).

** Genes regulados negativamente (-).

*** A expressão gênica não diferiu do controle *mock* inoculado.

DISCUSSÃO

Os genes de plantas hospedeiras que facilitam o processo de infecção e permitem sustentar uma interação de compatibilidade podem ser classificados como genes de suscetibilidade viral (= genes S). Desta forma, uma mutação de um gene S crucial pode, por conseguinte, limitar a capacidade do patógeno para causar doença (Van Schie & Takken, 2014). Neste contexto, a identificação e caracterização de genes S é uma das etapas que podem permitir a manipulação genética de plantas hospedeiras visando o estabelecimento de estratégias de controle via modificação estrutural desses fatores.

No presente trabalho foi conduzida uma análise transcritômica de uma interação compatível entre *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’– GRSV tendo como objetivo catalogar o repertório de genes modulados pela infecção viral em uma hospedeira altamente suscetível. De acordo com o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo do transcritoma da resposta do tomateiro à infecção por GRSV utilizando a técnica de RNAseq. Desta forma, os resultados aqui obtidos podem aportar novos conhecimentos visando identificar genes chaves que são ativados e/ou desativados na interação compatível entre o tomateiro e o GRSV, que é, atualmente, um dos mais importantes patógenos virais dessa hortaliça no Brasil (Lima *et al.*, 2015).

A análise quantitativa (Figura 1) dos DEGs (genes diferencialmente expressos) indicou, de maneira global, uma regulação negativa da expressão gênica no tomateiro após a infecção por GRSV, ou seja: foi observada uma redução de 63% dos DEGs positivamente regulados no período 0DAI para 36% em 3-5DAI, e aumento de 37% dos genes negativamente regulados no período 0DAI para 64% em 3-5DAI. Esta inibição geral de genes do tomateiro pode ser explicada pelo fato dos tospovírus atuarem controlando a maquinaria de transcrição e tradução da hospedeira e inativando genes de defesa. Dentre os modelos que tentam explicar a expressão de sintomas e o desenvolvimento de doenças, o modelo

competitivo sugere que os vírus de plantas se replicam de forma a usurpar uma quantidade substancial de recursos metabólicos/biossintéticos de uma planta, afetando adversamente seu crescimento e desenvolvimento (Culver & Padmanabhan, 2007). RNAs virais contêm estruturas únicas, tais como sítios de acoplamento aos ribossomos ou sequências potenciadoras da tradução, que fornecem uma vantagem competitiva ao acesso à maquinaria metabólica/biossintética celular pelo vírus quando comparado com os mRNAs da própria planta hospedeira (Thivierge *et al.*, 2005). O fato dos tospovírus utilizarem a estratégia de *cap-snatching* para a tradução de suas proteínas (Turina *et al.*, 2016) constitui uma vantagem adicional para este grupo de patógenos uma vez que estes capturam/sequestram segmentos de mRNAs da planta hospedeira para realizar a tradução de suas proteínas, causando severos distúrbios no sistema de tradução de proteínas da planta.

O foco da presente análise foi analisar os principais eventos desencadeados na interação compatível entre a variedade ‘Santa Clara’ e GRSV. Como esperado, os genes específicos para a interação incompatível tospovírus–plantas resistentes encontrados em experimentos de RNAseq descritos na literatura (*ex. Gamage et al.*, 2016) foram encontrados em níveis bastante reduzidos no presente estudo (Figura 2), dentre estes, os genes relacionados as categorias de ‘immune system process’ (0,3-0,4%) ‘antioxidant activity’ (0,4-0,5%) e ‘electron carrier activity’ (0- 2,1%). O maior número de DEGs (incluindo os genes positiva e negativamente regulados) foi anotado na categoria ‘funções moleculares’, seguida das categorias ‘processos biológicos’ e ‘componentes celulares’ (Figura 2). Estas alterações parecem refletir a intensificação de alterações celulares deletérias que se processam com o decorrer da infecção, uma vez que em interações compatíveis os vírus manipulam uma variedade de fatores do hospedeiro, tais como proteínas, membranas, lipídios e metabólitos. Portanto, o processo de replicação viral afeta o metabolismo, altera fluxo normal de rotas

biossintéticas bem como a estrutura celular do hospedeiro e define o padrão de patogênese e a expressão de sintomas típicos de cada interação vírus – planta (Hyodo & Okuno, 2016).

Um dos mecanismos gerais de defesa que é ativado imediatamente após a invasão de vírus em plantas hospedeiras é o silenciamento de RNA ou RNA interferente (RNAi) (Voinnet, 2009). Este mecanismo é desencadeado por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), as quais são reconhecidas e clivadas por enzimas do tipo *Dicer-like* (DCL), dando origem a pequenos fragmentos (siRNA) que, unidos aos RISCs, mobilizam fatores para a degradação específica dos mRNAs alvo (Sharma *et al.*, 2013; Pumplin & Voinnet, 2013). Neste contexto, vale salientar que o gene **LOC104647250** (*Suppressor of gene silencing 3-like*) foi identificado entre os 20 genes com o maior nível de regulação negativa (≈ 111.309) nos períodos 3-5DAI e 7-10DAI, quando comparado com o controle *mock* inoculado. Esse gene também conhecido com *SGS3* é necessário para o silenciamento gênico postranscricional de vírus (Muangsan *et al.*, 2004). A inibição drástica desse gene nas plantas de ‘Santa Clara’ infectadas por GRSV pode estar relacionada com o elevado acúmulo viral que ocorreu exatamente dentro de um período crítico do processo infeccioso e no mais intenso período de expressão de sintomas no tomateiro (3-5DAI a 7-10DAI). A regulação negativa de *SGS3* é, possivelmente, resultado da atuação da proteína viral NSs cuja principal função é suprimir o silenciamento de RNAi (uma das respostas universais de defesa de plantas hospedeiras). A universalidade da estratégia de defesa via silenciamento (que é extremamente conservada no reino vegetal) bem como a especificidade e a eficiência que o GRSV apresentou em desativar um gene regulador chave desse mecanismo pode servir como modelo teórico para explicar o amplo círculo de plantas hospedeiras que este vírus possui.

A proteína NSs é reconhecida como uma forte supressora do silenciamento gênico (Takeda *et al.*, 2002). De fato, Schnettler *et al.* (2010) demonstraram que a proteína NSs de TSWV e GRSV liga-se a dsRNAs curtos de maneira extremamente eficiente e,

possivelmente, impede a ativação do complexo RISC pelo sequestro seletivo de siRNA. **Hagen et al. (2011)** demonstraram que a proteína NSs não impede que enzimas ‘dicer’ fragmentem os dsRNAs provenientes dos intermediários de replicação viral. Através de técnicas de sequenciamento massal (Illumina RNA-seq), usando exclusivamente coleções de pequenos RNAs (siRNAs) **Hagen et al. (2011)** foram capazes de montar 99% do genoma completo dos três segmentos genômicos de TSWV. Esses resultados sugerem que a atuação da proteína NSs ocorre em uma etapa posterior ao do funcionamento das proteínas ‘dicer’. Nesse mesmo estudo usando a tecnologia de *deep sequencing*, **Hagen et al. (2011)** detectaram em abundância siRNAs derivados da clivagem de TSWV aos 4 DAI em plantas de tomateiro, entretanto os sintomas só se tornaram visíveis após os 7DAI. A maior abundância de siRNA derivados de TSWV foi detectado aos 10DAI mostrando a elevada acumulação viral e indicando que apesar de o sistema de defesa por RNAi estar ativo e alvejando o RNA viral, o vírus se mostrou capaz de contornar esse sistema e estabelecer a infecção. Essas observações sugeriram que o supressor viral (NSs) do sistema de defesa da hospedeira (RNAi) possivelmente interfere em uma etapa posterior à clivagem por *dicer* (**Hagen et al., 2011**). No presente trabalho, na interação compatível entre cv. ‘Santa Clara’ – GRSV foi verificado que as alterações nos processos celulares normais ocorreram de maneira mais intensa nos estágios finais da infecção viral, sugerindo que a elevada acumulação de GRSV no tecido hospedeiro resulta em um processo amplo de inibição da expressão de genes cruciais para o desenvolvimento do tomateiro e para ativação de respostas de defesa.

Após invadir as células do hospedeiro, os vírus iniciam o processo de infecção através da replicação, tradução e movimento intercelular e sistêmico, garantindo sua multiplicação e distribuição (**Hyodo & Okuno, 2016**). Para a replicação de seus ácidos nucleicos os vírus induzem a formação de complexos de replicação viral (***Virus Replication Complex – VRC***), que são estruturas membranosas similares a organelas, formadas através da associação da

replicase viral, RNAs virais e proteínas mobilizadas do hospedeiro (den Boon & Ahlquist, 2010; Wang, 2015). Estas membranas podem ser derivadas do ER, do complexo de golgi, das mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos, tonoplastos ou das membranas plasmáticas (Miller & Krijnse-Locker, 2008; Laliberté & Sanfaçon, 2010). Tem sido demonstrado que os vírus se apropriam de fatores da planta hospedeira envolvidos no tráfico/trânsito através de membranas e também de produtos do metabolismo de lipídeos para o estabelecimento dos VCRs (Hyodo & Okuno, 2016). A formação do VCR induz a proliferação e modificações de membranas intracelulares do hospedeiro. Estas alterações nas membranas podem resultar em resposta de morte celular do hospedeiro (Hashimoto *et al.*, 2015). No presente estudo, um repertório variado de genes associados às membranas foi regulado negativamente nos períodos 3-5DAI e 7-10DAI (Tabela 7), sugerindo que as alterações ultraestruturais durante o processo de montagem da partícula viral resultam em alterações no perfil de expressão gênica da planta de tomateiro infectada.

A mobilização de fatores hospedeiros de iniciação da tradução eucariótico (eIFs) constitui uma importante e extremamente conservada estratégia que os vírus se utilizam para guiar o processo de tradução de suas proteínas (Nagy, 2016). Por exemplo, a ligação da proteína VPg presente no terminal 5' dos potyvírus com a proteína eIF4E/eIFiso4 do hospedeiro é essencial para a tradução do RNA viral (Wittmann *et al.*, 1997; Wang & Krishnaswamy, 2012). No presente trabalho foi demonstrada a presença do gene **LOC101261616** (com altos níveis de expressão no período 3-5DAI – 11.297 *up*). O gene **LOC101261616** codifica uma proteína (ainda não caracterizada) que é similar a fatores de alongação da tradução descritos em *Arabidopsis*. Um segundo fator de alongação encontrado no presente trabalho foi o **LOC101254068**, similar a um fator de iniciação da tradução (**EIF1AD**). A variabilidade de fatores de tradução em plantas tem sido descrita como um determinante crucial da compatibilidade vírus – planta hospedeira em distintos patossistemas

(Nagy, 2016). Desta forma, estudos de caracterização funcional desta nova isoforma (LOC101261616) e também do alelo EIF1AD deverão ser conduzidos com maior detalhe em trabalhos futuros.

Em um estudo recente sobre a replicação e transcrição de TSWV foi demonstrado que o fator de alongação da tradução eEF1A se associa com a RNA polimerase II e tem um papel na alongação da transcrição de mRNAs virais. Este fator do hospedeiro foi requerido para a transcrição e replicação viral, uma vez que a aplicação de inibidores dessa proteína (ex. didemnin B) inibiu a transcrição do genoma viral (Komoda *et al.*, 2014). Neste caso específico, o fator de iniciação da tradução exerce uma função não canônica ou não comum, facilitando a transcrição. Desta forma, não podemos descartar a possibilidade de que dos fatores de tradução identificados no presente trabalho sejam capazes de atuar em outras etapas da replicação viral além da tradução.

A análise dos genes regulados positivamente demonstrou que, com o decorrer da infecção, alguns processos celulares no tomateiro foram inibidos, uma vez que muitos genes que foram regulados positivamente no período 0DAI se mostraram significativamente negativos nos períodos subsequentes. Com relação à subcategoria ‘plasmodesmas’ ao analisar apenas os genes positivos foi observado que (considerando a *fold change* ≥ 2) a maioria deles foi detectada no período 0DAI (Tabela 6). Esses dados sugerem que genes associados com plasmodesmas foram inibidos com o avanço do processo de infecção viral (3-5DAI e 7-10DAI). As células vegetais são envolvidas por celulose, o que impede o contato intercelular direto. Para viabilizar a comunicação celular, as plantas desenvolveram uma rede de canais (plasmodesmas) que são essenciais para facilitar o transporte de pequenas moléculas tais como compostos derivados do processo fotossintético e macromoléculas de sinalização (fatores de transcrição e RNAs) (Burch-Smith & Zambryski, 2016). Os plasmodesmas não são canais passivos, mas são altamente dinâmicos e alteram suas aberturas em resposta a

sinais intracelulares tais como espécies reativas de oxigênio, hormônios e homeostase das mitocôndrias e cloroplastos. Até o momento, o mecanismo mais conhecido de controle dos níveis de transporte nos plasmodesmas é a deposição (reversível) de polissacarídeos (especialmente calose) na parede celular que circunda imediatamente os canais de plasmodesmata (Burch-Smith & Zambryski, 2016). Os vírus de plantas, muito provavelmente, evoluíram estratégias para neutralizar mecanismos inatos de regulação de plasmodesmas e permitir a sua propagação infecciosa. Neste contexto, a redução nos níveis de expressão de genes que codificam para proteínas localizadas nos plasmodesmas parece ser resultado de alterações mediadas pelo GRSV durante o movimento intercelular, uma vez que a proteína viral Nsm induz a formação de estruturas tubulares para facilitar a translocação do RNA viral associado com a nucleoproteína (Storms *et al.*, 1995). É muito provável que estas alterações estruturais e funcionais dos plasmodesmas (mediadas pela infecção viral) possam levar a um distúrbio no fluxo intracelular de moléculas. Essas alterações podem desencadear efeitos pleiotrópicos com múltiplas consequências negativas para a fisiologia da planta e induzir muitos dos componentes do quadro sintomatológico tipicamente observado na interação tomateiro – GRSV. Recentemente foi demonstrado que a proteína NSm de TSWV interage em um contexto intercelular com a membrana do ER de *N. benthamiana* por meio dos plasmodesmas e que esta interação é necessária para a movimentação da proteína NSm e de TSWV entre as células (movimento célula-a-célula) (Dietzgen *et al.*, 2012; Leastro *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016).

No presente trabalho, genes envolvidos com detoxificação celular apresentaram regulação positiva nos períodos 0DAI e 7-10DAI, como peroxidases, glutatona e superóxido dismutase. Entretanto, no período 7-10DAI apenas dois genes com ação detoxificante foram regulados positivamente (Tabela 10). De modo semelhante Nachappa *et al.* (2013) também reportaram a expressão positiva das proteínas peroxidases, glutatona, catalase e superóxido

dismutase em tomateiro em resposta à infecção por TSWV. Estas enzimas fazem parte de um complexo de detoxificação e estão envolvidas na proteção celular contra espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando presentes em níveis elevados tornam-se tóxicas a célula. A produção de ROS [tais como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila] está associada com respostas de defesa da planta à infecção por organismos avirulentos (Lamb & Dixon, 1997). A explosão oxidativa participa de um sistema integrado e amplificado de sinalização, que envolve o ácido salicílico e cálcio (Ca^{2+}) citosólico no disparo dos mecanismos de defesa (Lamb & Dixon, 1997). O desenvolvimento da HR, inicialmente desencadeado pela presença de ROS, promove o estabelecimento gradual da resistência sistêmica adquirida (SAR) (Alvarez *et al.*, 1998). A redução dos níveis de expressão de genes associados com detoxificação celular com o progresso da infecção por GRSV, possivelmente ocorreu devido à ausência de ROS, uma vez que esta é uma interação compatível onde há o estabelecimento de uma infecção sistêmica devido à ausência de genes de resistência e/ou ao atraso na ativação das respostas de defesa da planta.

Ainda com base na análise dos genes regulados positivamente em resposta a infecção por GRSV, verificou-se que o maior número de genes superexpressos na categoria de ‘funções moleculares’, subcategoria ‘atividade de transdução de sinais’ foi identificado no período 0DAI (Tabela 8). Dentre estes, o que codifica para a proteína serine threonine- kinase ppk11-like (LOC101249831) apresentou os maiores níveis de expressão. No entanto, outros genes que codificam para proteínas do tipo MAPK kinases também foram superexpressos. Estas constituem uma classe específica de proteínas serina/treonina quinases, ou seja, proteínas que fosforilam resíduos de aminoácidos serina e treonina que estão envolvidas em diversos mecanismos celulares em resposta a sinais externos. Curiosamente, esse grupo de proteínas foi também reportado com superexpressão em interações incompatíveis entre

begomovírus e tomateiro ([Carmo et al., 2017](#)). Estas proteínas estão envolvidas na cascata de sinalização da imunidade desencadeada por PAMPs (PTI) e podem ser ativadas por uma variedade de estresses abióticos, como por exemplo, injúria mecânica, alta salinidade e alta ou baixa osmolaridade, bem como por eliciadores derivados de patógenos que não induzem HR ([Zhang & Klessig, 2001](#)). Na percepção dos PAMPs pelos receptores PRRs, as plantas ativam diferentes respostas de defesa, incluindo ativação da cascata de MAP quinases (MAPKs, proteínas quinases ativadas por mitógenos) ([He et al., 2007](#); [Resende et al., 2007](#)). No presente estudo a ativação de proteínas quinases no início da infecção pode ser resultado do dano mecânico ocasionado durante o processo de inoculação mecânica usando *Carburundum*, uma vez que segundo [Luan \(2003\)](#), injúrias físicas podem ativar uma MAPK rapidamente (frequentemente alcançando um pico de atividade dentro de poucos minutos) e a atividade MAPK subsequentemente retorna ao nível basal para cessar o processo de sinalização.

Na análise apenas dos genes regulados positivamente relacionados à ‘fatores de transcrição de ligação a proteínas’ (considerando a *fold change* de ≥ 2) foi verificado que nos períodos 3-5DAI e 7-10DAI não houve genes significativamente positivos ([Tabela 9](#)). No entanto, um grande número de genes que codificam proteínas da família TIFY foi observado apenas no período 0DAI. Estas proteínas atuam como repressoras da transcrição da via de sinalização do ácido jasmônico através da interação com uma variedade de fatores de transcrição ([Bai et al., 2011](#); [Kazan & Manners, 2012](#)). O fato de esses genes serem superexpressos apenas no período 0DAI pode estar diretamente relacionado aos elevados níveis de expressão de genes que codificam para vias do ácido jasmônico também apenas no período 0DAI, possivelmente ativado pelo ferimento ocasionado pelo processo de inoculação.

Na análise de genes diferencialmente expressos com foco em ‘cloroplastos’ e em ‘componentes dos cloroplastos relacionados aos processos fotossintéticos’, foi verificada uma

redução no número de DEGs nos períodos de 0DAI a 7-10DAI, considerando a *fold change* de ≥ 2 (**Tabela 11**). O maior número de genes positivamente regulados foi verificado no período 0DAI. A interferência viral na estrutura e função dos cloroplastos conduz invariavelmente a uma redução da atividade fotossintética, resultando em sintomas típicos de clorose e mosaico (**Rahoutei et al., 2000; Guo et al., 2005; Christov et al., 2007; Kyseláková et al., 2011; Manfre et al., 2011**). Neste estudo, as alterações transcricionais em genes associados a processos fotossintéticos observadas do período 0DAI a 7-10 DAI coincidem com a ocorrência de indução dos sintomas típicos de GRSV no tomateiro (manchas cloróticas, mosqueado nas folhas apicais e curvatura do ponteiro) que são usualmente visualizados em torno dos 7DAI. Aos 10 DAI foram visualizados sintomas mais severos da infecção por GRSV, incluindo deformação foliar e necrose foliar.

A análise do transcrito de plantas de crisântemo em resposta a infecção por três diferentes espécies virais revelou que *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Potato virus X* (PVX) induziram mudanças transcricionais mais intensas do que TSWV. Em crisântemo a infecção por TSWV levou a superexpressão de genes relacionados a estímulos externos e internos. Os genes negativamente regulados foram relacionados a processos metabólicos de DNA, incluindo replicação, organização da cromatina, modificação de histonas e citocinese. A maioria dos genes que codificam para proteínas localizadas nos cloroplastos foram negativamente regulados pelos três vírus em estudo, incluindo o TSWV. De modo semelhante, **Catoni et al. (2009)** analisaram a resposta de plantas de tomateiro infectadas com TSWV utilizando a técnica de *microarray* e demonstraram a supressão de genes envolvidos no metabolismo energético, na fotossíntese, incluindo a *chlorophyll a/b-binding*, no metabolismo de pigmentos e fotorrespiração, indicando uma supressão geral do metabolismo primário que poderia estar correlacionada com o desenvolvimento de sintomas sistêmicos. **Nachappa et al. (2013)** também verificaram a regulação negativa de genes associados ao

citoplasma, plastídeos e tilacóides em tomateiro após a infecção por TSWV. Esses resultados, em conjunto, corroboram com os resultados obtidos no presente estudo envolvendo o patossistema tomateiro – GRSV.

Assim como o observado neste trabalho, alguns estudos sobre o efeito da infecção viral na expressão de proteínas dos cloroplastos em níveis transcricionais e proteômicos fornecem informações sobre os eventos moleculares desencadeados durante a expressão dos sintomas. Na resposta suscetível à infecção viral, a maioria das proteínas significativamente alteradas está localizada em cloroplastos ou associada às membranas dos cloroplastos. Nesses estudos a maioria dos genes foram negativamente regulados e correlacionados com a intensidade dos sintomas de clorose ([Dardick, 2007](#); [Shimizu *et al.*, 2007](#); [Lu *et al.*, 2012](#); [Rodríguez *et al.*, 2012](#); [Kundu *et al.*, 2013](#); [Wu *et al.*, 2013](#); [Mochizuki *et al.*, 2014](#)).

Recentemente, [Leastro *et al.* \(2015\)](#) demonstraram a possível associação física da proteína de movimento (NSm) de quatro espécies de *Tospovirus* com a periferia dos cloroplastos, sugerindo o possível envolvimento de cloroplastos com o processo de replicação ou movimentação viral. Para espécies virais do gênero *Potyvirus* está bem elucidado que a replicação viral ocorre nos cloroplastos, através da formação de vesículas, tendo o auxílio de fatores virais em associação com proteínas transmembranas dos cloroplastos ([Wei *et al.*, 2010](#)).

Os cloroplastos são organelas metabolicamente versáteis, sendo o sítio da fotossíntese, do metabolismo de ácidos graxos, da assimilação de nitrato e da biossíntese de aminoácidos ([Waters & Langdale, 2009](#); [Jarvis & Lopes-Juez, 2013](#)). Os cloroplastos também exercem funções nas respostas de defesa da planta via biossíntese de moléculas sinalizadoras tais como ácidos graxos e seus derivados, ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA) ([Wasternack & Hause, 2013](#)). Dentre os genes que codificam para proteínas localizadas nos cloroplastos o gene *AOS2* (que codifica para a proteína *allene oxide synthase 2*) apresentou o maior nível de

expressão no início do processo infeccioso, entretanto ocorreu uma grande redução da expressão nos períodos finais da infecção (**Tabela 11**). Uma série de proteínas do tipo AOS em plantas estão localizadas nos cloroplastos (**Vick and Zimmerman 1987; Laudert et al. 1996; Maucher et al. 2000; Froehlich et al. 2001**). A *allene oxide synthase 2* catalisa o primeiro passo na biossíntese de ácido jasmônico a partir de hidroperóxidos derivados de lipoxigenases de ácidos graxos livres. Em *Arabidopsis*, jasmonatos não foram produzidos em um mutante para *allene oxide synthase*, resultando em plantas extremamente suscetíveis à bactéria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (**Pajerowska-Mukhtar et al., 2008**). No presente trabalho, envolvendo o estudo de uma interação compatível, foi demonstrado que não houve aumento no número de transcritos do gene AOS, o qual foi observado em níveis elevados apenas no período ODAI. Esse padrão de expressão sugere que a síntese de ácido jasmônico é reduzida no decorrer da infecção viral. De modo semelhante ao observado em interações compatíveis entre batata e *Phytophthora infestans* (**Weber et al. 1999; Gobel et al. 2002**). Esses dados indicam que este pode ter sido um dos genes seletivamente ‘desligados’ pelo GRSV durante o processo de infecção da cultivar ‘Santa Clara’. Por sua vez, a expressão desse gene pode ter sido induzida nos primeiros momentos da infecção devido às injúrias ocasionadas durante o processo de inoculação mecânica de GRSV que foi feita empregando substâncias abrasivas. Este fato é substanciado por um trabalho que indicou a indução dos níveis de mRNA do gene AOS após ferimentos em tomateiro (**Sivasankar et al., 2000**). Além disso, foi mostrado que a expressão de mRNA do gene AOS começou a declinar cerca de 4 horas após a indução (**Sivasankar et al., 2000**).

No decorrer da multiplicação viral, um grande número de proteínas é sintetizado em um período de tempo relativamente curto. Desta forma, o enovelamento correto dessas proteínas pode se tornar um fator limitante. Para contornar este problema, muitos vírus recrutam chaperonas celulares, as quais possuem um papel importante no enovelamento

correto e na estabilidade de proteínas (Mayer, 2005; Nagy *et al.*, 2011; Verchot, 2012). A proteína HSP70 é ativada sob condições adversas tais como calor excessivo, infecção viral e estresse oxidativo (Verchot, 2012; Chen *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2010). Proteínas homólogas de HSP70 foram apontadas com cruciais no movimento célula-a-célula de closterovírus e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLSV) em tomateiro (Alzhanova *et al.*, 2001; Avisar *et al.*, 2008; Gorovits, *et al.*, 2013). Em outros trabalhos semelhantes, foi demonstrada a associação de HSP70 ao complexo replicativo de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), a qual desempenha um papel importante na inserção deste complexo nos peroxisomos durante a infecção viral (Wang, *et al.*, 2009; Pogany *et al.*, 2008). No presente trabalho, o gene er-sHSP (pertencente a família *small Heat-Shock Protein* – HPS20) foi identificado com altos níveis de expressão nos períodos 0DAI e 3-5DAI demonstrando que o maior número de transcritos referente ao gene er-sHSP ocorreu nos estágios iniciais do processo de infecção viral (Tabela 12). A expressão durante os eventos iniciais provavelmente ocorreu devido à acumulação de proteínas virais estruturadas (dobradas) de forma defectiva no ER das células o que levou a ativação da via UPR (*unfolded protein response*) e conseqüentemente induziu a expressão de chaperonas localizadas no retículo endoplasmático. DNA-J um membro da família de chaperonas HSP40 (*heat shock protein 40 kD*) foi a primeira proteína identificada em tomateiro interagindo com a proteína Nsm de tospovírus, sugerindo que o movimento de progênes infecciosa (RNPs) possivelmente envolve um mecanismo que requer HSP-70 (Soellick, 2000; Von Bargen *et al.*, 2001). No presente trabalho, o gene LOC101267425 (que tem como produto gênico a *chaperone dnaJ chloroplastic-like*, associada com cloroplastos) foi significativamente superexpresso nos período 0 e 7-10DAI, sendo duas vezes regulado positivamente com relação ao controle *mock* inoculado, sugerindo que essa proteína pode interferir no movimento célula-a-célula do vírus, uma vez que recentemente Leastro *et al.* (2015) demonstraram a associação da proteína NSm

com membranas dos cloroplastos. De maneira análoga, [Nachappa et al. \(2013\)](#) demonstraram que a infecção por TSWV em tomateiro induziu significativamente a expressão das proteínas *heat shock* HSP70 e HSP17.6.

Alterações transcricionais em genes que codificam proteínas relacionadas à estrutura e funções do ‘retículo endoplasmático’ e ‘complexo de Golgi’ foram visualizadas pela redução gradativa no número de genes e níveis de transcritos expressos em tomateiro em resposta a infecção por GRSV. Essas organelas estão diretamente envolvidas com o processo de montagem/síntese das partículas de espécies de *Tospovirus*. A presença de partículas virais de TSWV dentro do retículo endoplasmático (ER) e também nas membranas do envelope nuclear foi primeiramente reportada por [Kitajima \(1965\)](#). Posteriormente foi demonstrado que membranas paralelas pareadas (PPM), derivadas do complexo de Golgi formam o local da morfogênese de partículas virais duplamente envelopadas (DEVs). Em um estágio final de maturação, o complexo de ribonucleoproteínas presentes no citoplasma é envolvido pelas PPMs para dar origem a DEVs. Em seguida ocorre a fusão entre DEVs e a fusão de DEVs com membranas do ER para dar origem a partículas virais maduras com um único envelope (SEVs – *single-enveloped virus particles*) resultando na formação de grandes vesículas dentro do citoplasma ([Kitajima et al., 1992](#); [Kikkert et al., 1999](#); [2001](#)). As glicoproteínas virais acumulam no complexo de Golgi antes do processo de envelopamento e induzem a formação de estruturas membranosas derivadas do complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Em adição, ambas as glicoproteínas interagem com a proteína N de TSWV e RNPs no ER e no complexo de Golgi ([Ribeiro, 2009](#)). Esses estudos demonstrando o envolvimento direto de membranas do complexo de Golgi e ER na formação das partículas virais de tospovírus estão de acordo com as alterações observadas nos níveis de transcrição de genes associadas com essas organelas após a infecção de ‘Santa Clara’ por GRSV. Essas alterações nos níveis de transcritos foram observadas pela inibição de genes que se encontravam positivamente

regulados no início da infecção e com a evolução do processo infeccioso (3-5DAI e 7-10DAI) foram negativamente regulados (**Tabelas 12 e 13**), sugerindo que o distúrbio celular ocasionado pelo GRSV interfere na expressão de genes essenciais para a planta (**Tabelas 12 e 13**).

Os genes **LOC104644463** (*F-box At3g07870-like*) e **LOC101246898** (*E3 ubiquitin-ligase RBBP6-like*) que codificam para proteínas ubiquitinas foram também identificados com diferencialmente expressos. As ubiquitinas possuem um papel duplo e/ou ambíguo no processo de infecção por patógenos, ora atuando em vias de defesa da planta, ora facilitando a infecção viral. Uma série de proteínas relacionadas com o Sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPS) incluindo a própria ubiquitina, foram relatadas como sendo induzidas por vírus (**Aranda et al., 1996, Whitham et al., 2003; Ye et al., 2011**). No entanto, na maioria dos casos, não está claro se o aumento da expressão é necessário para degradar proteínas celulares ou virais ou se faz parte de um conjunto de respostas gerais ao estresse celular devido à expressão e acúmulo de proteínas virais (**Aparicio et al., 2005, Vitale & Boston, 2008, Sugio et al., 2009**). Há evidências de que a usurpação das ligases E3 do hospedeiro é uma estratégia comum usada por vírus de plantas. As proteínas da classe E3 são as mais prevalentes em plantas (**Gagne et al., 2002**). Em todos os casos relatados até agora, observou-se que os vírus sequestraram uma classe particularmente versátil de E3 ligases, designada por complexos SCF (SKP1/Cullin1/F-box/RBX1) (**Lechner et al., 2006**). Neste estudo, o gene **LOC104644463** (*F-box At3g07870-like*), de acordo com a análise dos termos do *Gene Ontology*, foi identificado como parte do complexo SCF. Este gene foi positivamente regulado nos períodos 0DAI e 7-5DAI e a proteína *E3 ubiquitin-ligase RBBP6-like* foi identificada com altos níveis de expressão em todos os períodos avaliados, podendo sugerir que os vírus poderiam utilizar essas proteínas para completar o seu ciclo de infecção, ou que os vírus sequestram essas proteínas para modular e impedir a ativação de respostas de defesa

do hospedeiro. Foi sugerido que os vírus interferem no sistema UPS por inibir a interação de proteínas ubiquitinas com o alvo específico no hospedeiro alterando assim o reconhecimento apropriado do alvo conduzindo ao estabelecimento da patogênese e indução de sintomas (Thiel *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a proteína P25 codificada pelo benyvírus *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) interage com um número de proteínas com provável envolvimento na ubiquitinação (Thiel & Varrelmann, 2009). Entretanto, não existem ainda estudos que demonstrem a interação de tospovírus com o sistema UPS.

Genes diferencialmente expressos que codificam para ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), etileno (ET), auxinas (IAA) e ácido abscísico (ABA), apresentaram os maiores níveis de expressão no início do processo infeccioso. Como mencionado anteriormente, estes hormônios estão envolvidos na sinalização de respostas de defesa em plantas e em processos de desenvolvimento. O processo de sinalização das plantas pode ser dividido em três etapas básicas: percepção do sinal, transdução e tradução de sinal. A percepção de sinais consiste no reconhecimento de um eliciador por receptores celulares levando à indução de respostas de defesa (Resende *et al.*, 2007). Após o reconhecimento este sinal é transmitido de forma direta ou indireta para o sítio de ação dentro da célula (Resende *et al.*, 2007). Moléculas sinalizadoras como ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e auxina estão relacionadas com a regulação de respostas de defesa em plantas através da transdução de sinais (McDowell & Dangl, 2000).

Dos DEGs identificados codificando para genes relacionados com as vias do ácido salicílico foram identificados dois genes regulados positivamente nos períodos 0DAI e 3-5DAI e apenas um no período 7-10DAI (Tabela 16). Os maiores níveis de expressão foram observados para os genes **LOC101256808**/SAMT que codifica para *salicylate carboxymethyltransferase-like* (8.736 fold change) e **LOC101265080** codificando para *salicylic acid-binding 2-like* (4.404 fold change). A enzima *salicylate*

carboxymethyltransferase-like converte SA em metil-salicato (MeSA) (Ross *et al.*, 1999). E a proteína *salicylic acid-binding 2-like* (SABP2) é necessária para converter o metil-salicato (MeSA) em ácido salicílico (SA) como parte das vias de transdução de sinal que ativam a resistência sistêmica adquirida (SAR) (Forouhar *et al.*, 2005). O estabelecimento da resistência sistêmica envolve o deslocamento de moléculas sinalizadoras do local da infecção para os demais órgãos e tecidos da planta. Este mecanismo de defesa é induzível e confere resistência de longa duração contra um amplo espectro de patógenos e atua nas plantas em locais distantes do sítio de infecção (Durrant & Dong 2004). O ácido salicílico, por sua vez, regula a expressão de diferentes genes relacionados à defesa vegetal como proteínas PR e PAL (fenilalanina amônia liase) (Spoel & Dong, 2012; Fu & Dong, 2013). Pieterse *et al.* (2005) relatam que o SA está envolvido na sinalização de mecanismos de defesa de plantas, sozinho ou em conjunto com outros sinalizadores endógenos como MeJA, ET e ácido abscísico (ABA) (Pieterse *et al.*, 2005).

Além do envolvimento na regulação de respostas de defesa contra patógenos biotróficos, estudos relatam o envolvimento do ácido salicílico na resistência basal das plantas. Lopez-Gresa *et al* (2016) estudaram o papel do ácido salicílico na resistência basal de plantas de tomateiro ao TSWV. Eles observaram que plantas de tomate infectadas com TSWV induziram a acumulação de SA, o qual começou em um nível basal muito baixo e aumentou notavelmente com o aparecimento dos primeiros sintomas da doença. Enquanto plantas incapazes de acumular o ácido salicílico (transgênicos expressando *NahG*) foram mais suscetível ao TSWV, apresentando uma alta acumulação do patógeno nos primeiros momentos da infecção. Plantas de tomateiro ‘Money Maker’ infectadas com TSWV induziu uma alta acumulação de SA, como relatado em outras interações compatíveis (Bellés *et al.*, 1999; Bellés *et al.*, 2008). Um trabalho semelhante, investigando mudanças nas vias de defesa do SA e JA em plantas inoculadas com TSWV através da alimentação por tripes, revelou uma

regulação positiva da via SA apenas nas plantas infectadas. Embora a alimentação de tripes induza normalmente a resposta anti-herbívoro (JA) em plantas, a infecção por vírus suprime a via JA (Maris *et al.*, 2004; Abe *et al.*, 2012). Por outro lado, Nachappa *et al.* (2013) estudando a interação de TSWV com o ácaro (*Tetranychus urticae*), não vetor de tospovírus, mostraram um aumento da preferência desses ácaros por plantas infectadas, em que análises do transcrito das plantas infectadas com TSWV indicaram uma regulação significativa de genes relacionados com o ácido salicílico (SA), mas sem uma aparente regulação negativa dos genes relacionados com o ácido jasmônico (JA) que poderiam potencialmente conferir resistência induzida contra o inseto. Isto sugere que não houve interferência antagônica entre as vias de sinalização para influenciar a interação entre TSWV e o ácaro.

No presente estudo foram identificados genes associados com as vias do ácido salicílico regulados positivamente nos três períodos avaliados indicando que estes poderiam estar envolvidos em vias de sinalização para o estabelecimento da resistência basal contra a infecção viral, enquanto as vias do ácido jasmônico foram ativadas apenas no início do processo infeccioso.

O ácido jasmônico e o etileno, são fitohormônios que participam das respostas de defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos (Crozier *et al.*, 2000), entre elas, a infecção por fitopatógenos necrotróficos e ferimentos mecânicos (Dong, 1998; Kachroo *et al.*, 2000). Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos associados com essas duas vias, o maior número de genes positivos foi observado no início do processo infeccioso (ODAI) (Tabela 16). Com relação ao etileno foram identificados vários genes codificando para fatores de transcrição do tipo ERF (*Ethylene-responsive transcription factor*), sugerindo o seu envolvimento na infecção viral e em vias de transdução de sinais mediadas por etileno. Em plantas de crisântemo infectadas por TSWV pelo menos três genes que codificam para fatores de transcrição responsivos ao etileno foram positivamente regulados (ERF) (Choi *et al.*,

2015). **Chen et al., (2013)** encontraram quatro genes positivamente regulados com *fold change* entre 4 ~ 6 em tomateiro resistente em resposta à infecção por TYLCV sugerindo que estes foram efetivos na regulação das vias de resistência à doença. Dos sete genes com expressão diferencial relacionados com as vias do ácido jasmônico, seis foram positivamente regulados apenas no período ODAI. Nos demais períodos estes genes foram negativamente regulados ou a expressão foi semelhante ao controle *mock* inoculado. Dentre esses, os DEGs que codificam para *jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like* (JAR1) e *NAC domain-containing 72-like* foram superexpressos em altos níveis (14.401 e 7.932 *fold change*) (**Tabela 16**). A enzima *jasmonic acid-amido synthetase JAR1-like* é responsável pela conjugação do ácido jasmônico com o aminoácido isoleucina, resultando na forma bioativa do ácido jasmônico com isoleucina (JA-Ile) (**Staswick &Tiryaki, 2004; Fonseca et al. 2009**). Esta enzima é requerida para a via de sinalização mediada por JA que regula vários mecanismos de defesa, resposta a ferimentos e a herbívoros. JAR1 desempenha um papel na acumulação de JA-Ile em resposta a ferimentos tanto local como sistemicamente (**Koo et al., 2009**). Em *Arabidopsis* selvagem o nível de transcrição de JAR1 atingiu maior pico uma hora após a indução do ferimento e foi acompanhada por um aumento de 25 vezes em JA-Ile (**Suza & Staswick, 2008**). Em adição JAR1 é necessário para a resistência dependente de JA a fungos como *Pythium irregulare*, *Uromyces vignae* e *Uromyces appendiculatus* (**Staswick et al.,1998**). O gene JAR1 está envolvido com a resistência sistêmica induzida contra *Ralstonia solaneraeum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* por meio de *Pythium oligandrum* (um agente de biocontrole não patogênico) (**Kawamura et al., 2009**). A proteína *NAC domain-containing 72-like* é um fator de transcrição chave na regulação da expressão de genes de defesa em plantas e desempenha um papel importante na regulação da reprogramação transcricional associada a respostas de estresses (**Nuruzzaman et al., 2013**).

Todos os trabalhos de transcriptoma citados neste estudo envolvendo tospovírus foram realizados com a espécie TSWV e em hospedeiro suscetível. No entanto, mais recentemente, **Gamage et al. (2016)** demonstraram a expressão diferencial de outra espécie de *Tospovirus* (*Capsicum chlorosis virus* – CaCV) em plantas de pimentão (*Capsicum annuum*) contendo o gene de resistência *Tsw* (**Boiteux & Avila, 1994**). O maior número de genes positivamente regulados incluiu aqueles relacionados à patogênese (PR *proteins*), genes associados à morte celular e vias de sinalizações mediadas por SA, JA, e ET bem como genes codificadores de enzimas envolvidas na síntese de metabolitos secundários relacionados a processos de defesa (**Gamage et al., 2016**). No presente estudo, embora as vias de sinalização tenham sido ativadas, não foram identificados DEGs relacionados com as proteínas do tipo PR.

CONCLUSÕES

O estudo do transcrito na interação compatível *Solanum lycopersicum* cv. ‘Santa Clara’-GRSV por meio da técnica de RNAseq permitiu a identificação de um grande repertório de genes com expressão diferencial principalmente nos primeiros estágios da infecção (0DAI e 3-5DAI). Mostrando que houve o desligamento de genes em tomateiro durante o processo de infecção por GRSV.

A análise dos 20 genes com maiores níveis de regulação negativa permitiu a identificação do gene **LOC104647250** que codifica para um *Suppressor of gene silencing 3-like* (SGS3) que é necessário para o silenciamento gênico postranscricional de vírus. Além disso, o gene que codifica para enzima *allene oxide synthase 2*, genes associados fatores de iniciação e alongação da tradução eucariótica, chaperonas e ubiquitinas estão entre os genes fortemente modulados durante a infecção por GRSV e que representam potenciais genes alvos para edição gênica.

Os resultados aqui obtidos demonstram interessantes correlações biológicas entre os níveis transcricionais de DEGs associados com a estrutura e funções do retículo endoplasmático, complexo de Golgi, plasmodesmas e fatores associados com a fotossíntese (cloroplastos, tilacóides e fotossistemas) e as correspondentes alterações ultraestruturais e sintomatológicas induzidas pelo GRSV durante o estabelecimento do ciclo infeccioso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE H, TOMITAKA Y, SHIMODA T, SEO S, SAKURAI T. **2012**. Antagonistic plant defense system regulated by phytohormones assists interactions among vector insect, thrips and a tospovirus. *Plant Cell Physiology* 53: 204–212.

ADHIKARI BN, SAVORY EA, VAILLANCOURT B, CHILDS KL, HAMILTON JP. **2012**. Expression profiling of *Cucumis sativus* in response to infection by *Pseudoperonospora cubensis*. *PLOS One* 7: e34954.

ALVAREZ ME, PENNEL RI, MEIJER PJ, ISHIKAWA A, DIXON RA, LAMB C. **1998**. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 1–20.

ALZHANOVA DV, NAPULI AJ, CREAMER R, DOLJA VV. **2001**. Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO Journal* 20: 6997–7007.

APARICIO F, THOMAS CL, LEDERER C, NIU Y, WANG D, MAULE AJ. **2005**. Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant Physiology* 138: 529–536.

ARANDA MA, ESCALER M, WANGE D, MAULE AJ. **1996**. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 15289–15293.

ARANDA PS, LAJOIE DM, JORCYK C. **2012**. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33: 366–369.

ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY JM, HARRIS MA. **2000**. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25: 25–29.

AVISAR D, PROKHNEVSKY AI, DOLJA VV. **2008**. Class VIII myosins are required for plasmodesmatal localization of a closterovirus Hsp70 homolog. *Journal of Virology* 82: 2836–2843.

BAI Y, MENG Y, HUANG D, QI Y, CHEN M. **2011**. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics* 98: 128–136.

BELLÉS JM, GARRO R, FAYOS J, NAVARRO P, PRIMO J, CONEJERO V. **1999**. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 227–235.

BELLÉS JM, LÓPEZ-GRESA MP, FAYOS J, PALLAÂS V, RODRIGO I, CONEJERO V. **2008**. Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants. *Plant Science* 174: 524–533.

- BENJAMINI Y, HOCHBERG Y. **1995**. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series 57*: 289–300.
- BOITEUX L, DE ÁVILA A. **1994**. Inheritance of a resistance specific to *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum chinense* ‘PI 159236’. *Euphytica* 75: 139–142.
- BOUALEM A, DOGIMONT C, BENDAHMAE A. **2016**. The battle for survival between viruses and their host plants. *Current Opinion in Virology* 17: 32–38.
- BUCHER E, SIJEN T, DE HAAN P, GOLDBACH R, PRINS M. **2003**. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology* 77: 1329–1336.
- BURCH-SMITH TM, ZAMBRYSKI PC. **2016**. Regulation of plasmodesmal transport and modification of plasmodesmata during development and following infection by viruses and viral proteins. In: Kleinow T, ed. *Plant–virus interactions*. Berlin: Springer, p. 87–122.
- CARMO LS, MURAD AM, RESENDE RO, BOITEUX LS, RIBEIRO SG, JORRÍN-NOVO, JV, MEHTA A. **2017**. Plant responses to tomato chlorotic mottle virus: Proteomic view of the resistance mechanisms to a bipartite begomovirus in tomato. *Journal of Proteomics* 151: 284–292.
- CATONI M, MIOZZI L, FIORILLI V, LANFRANCO L, ACCOTTO GP. **2009**. Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by *Tomato spotted wilt virus* reveals organ-specific transcriptional responses. *Molecular plant-microbe Interactions* 22: 1504–1513.
- CHEN Z, ZHOU T, WU X, HONG Y, FAN Z, LI H. **2008**. Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* 9: 809–817.
- CHEN T, LV Y, ZHAO T, LI N, YANG Y, YU W, HE S, LIU T, ZHANG B. **2013**. Comparative transcriptome profiling of a resistant vs. susceptible tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar in response to infection by *Tomato yellow leaf curl virus*. *PLoS One* 8: e80816.
- CHOI H, JO Y, LIAN S, JO KM, CHU H, YOON JY, CHOI S-K, KIM K-H, CHO WK. **2015**. Comparative analysis of chrysanthemum transcriptome in response to three RNA viruses: *Cucumber mosaic virus*, *Tomato spotted wilt virus* and *Potato virus X*. *Plant Molecular Biology* 88: 233–248.
- CHRISTOV I, STEFANOV D, VELINOV T, GOLTSEV V, GEORGIEVA K, ABRACHEVA P, GENOVA Y, CHRISTOV N. **2007**. The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown in vitro plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 164: 1124–1133.
- CROZIER A, YUJI K, BISHOP G, YOKOTA T. **2000**. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanam, B.B.; Grisse, W.; Jones, R.L. (Eds.). *Biochemistry Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland: APS Press, p.850–929.

CONESA A, GOTZ S, GARCIA-GOMEZ JM, TEROL J, TALON M, ROBLES M. **2005**. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674–3676.

CULVER JN, PADMANABHAN MS. **2007**. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annual Review Phytopathology* 45: 221–243.

DEN BOON JA, AHLQUIST P. **2010**. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annual Review of Microbiology* 64: 241–256.

DARDICK C. **2007**. Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20: 1004–1017.

DIANESE, EC, FONSECA, MEN, GOLDBACH, R., KORMELINK, R., INOUE-NAGATA, AK, RESENDE, RO; BOITEUX, LS **2010**. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Molecular Breeding* 25: 133–142.

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

DIETZGEN RG, MARTIN KM, ANDERSON G, GOODIN MM. **2012**. *In planta* localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *Journal of General Virology* 93: 2490–2495.

DONG X. **1998**. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 316–323.

DURRANT WE, DONG X. **2004**. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185–209.

FENG Z, CHEN X, BAO Y, DONG J, ZHANG Z, TAO X. **2013**. Nucleocapsid of *Tomato spotted wilt tospovirus* forms mobile particles that traffic on an actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. *New Phytologist* 200: 1212–1224.

FENG Z, XUE F, XU M, CHEN X, ZHAO W, GARCIA-MURRIA MJ, MINGARRO I, LIU Y, HUANG Y, JIANG L, ZHU M, TAO X. **2016**. The ER-membrane transport system is critical for intercellular trafficking of the NSm movement protein and *Tomato Spotted Wilt Tospovirus*. *PLoS Pathogens* 12: e1005443.

FONSECA S, CHINI A, HAMBERG M, ADIE B, PORZEL A, KRAMELL R, MIERSCH O, WASTERNAK C, SOLANO R. **2009**. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 5: 344–350.

FOROUHAR F, YANG Y, KUMAR D, CHEN Y, FRIDMAN E, PARK SW, KLESSIG D F. **2005**. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate

esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 1773–1778.

FROEHLICH JE, ITOH A, HOWE GA. **2001**. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology* 125: 306–317.

FU ZQ, DONG X. **2013**. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64: 839–863.

GAGNE JM, DOWNES BP, SHIU SH, DURSKI AM, VIERSTRA RD. **2002**. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 11519–11524.

GAMAGE SMW, MCGRATH DJ, PERSLEY DM, DIETZGEN RG. **2016**. Transcriptome analysis of *Capsicum chlorosis virus*-induced hypersensitive resistance response in bell *Capsicum*. *PLoS One* 11: e0159085.

GOBEL C, FEUSSNER I, HAMBERG M, ROSAHL S. **2002**. Oxylipin prowling in pathogen-infected potato leaves. *Biochimistry Biophysics Acta* 1584: 55–64.

GOROVITS R, MOSHE A, GHANIM M, CZOSNEK H. **2013**. Recruitment of the host plant heat shock protein 70 by *Tomato yellow leaf curl virus* coat protein is required for virus infection. *PLoS One* 8: e70280.

GOYER A, HAMLIN L, CROSSLIN JM, BUCHANAN A, CHANG JH. **2015**. RNA-Seq analysis of resistant and susceptible potato varieties during the early stages of potato virus Y infection. *BMC Genomics* 16: 472.

GUO DP, GUO YP, ZHAO JP, LIU H, PENG Y, WANG QM. **2005**. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Science* 168: 57–63.

HAGEN C, FRIZZI A, KAO J, JIA L, HUANG M, ZHANG Y, HUANG S. **2011**. Using small RNA sequences to diagnose, sequence, and investigate the infectivity characteristics of vegetable-infecting viruses. *Archives of Virology* 156: 1209–1216.

HASHIMOTO M, KOMATSU K, IWAI R, KEIMA T, MAEJIMA K, SHIRAISHI T, YAMAJI Y. **2015**. Cell death triggered by a putative amphipathic helix of radish mosaic virus helicase protein is tightly correlated with host membrane modification. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 675–688.

HE P; SHAN L, SHEEN J. **2007**. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell Microbiology* 9: 1385–1396.

HYODO K, OKUNO T. **2016**. Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses. *Current Opinion in Virology* 17: 11–18.

- JARVIS P, LOPEZ-JUEZ E. **2013**. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 787–802.
- KACHROO P, YOSHIOKA K, SHAH J, DOONER KD, KLESSIG DF. **2000**. Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* 12: 677–690.
- KAWAMURA Y, TAKENAKA S, HASE S, KUBOTA M, ICHINOSE Y, KANAYAMA Y, TAKAHASHI H. **2009**. Enhanced defense responses in *Arabidopsis* induced by the cell wall protein fractions from *Pythium oligandrum* require SGT1, RAR1, NPR1 and JAR1. *Plant and Cell Physiology* 50: 924–934.
- KAZAN K, MANNERS, JM. **2012**. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science* 17: 22–31.
- KIKKERT M, VAN LENT J, STORMS M, BODEGOM P, KORMELINK R, GOLDBACH R. **1999**. Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. *Journal of Virology* 73: 2288–2297.
- KIKKERT M, VERSCHOOR A, KORMELINK R, ROTTIER P, GOLDBACH R. **2001**. Tomato spotted wilt virus glycoproteins exhibit trafficking and localization signals that are functional in mammalian cells. *Journal of Virology* 75: 1004–1012.
- KITAJIMA EW. **1965**. Electron Microscopy of Tomato Spotted Wilt Virus (*Brazilian Tomato Spotted Wilt Virus*) within the Host Cell. *Virology* 26: 89–99.
- KITAJIMA EW, DE ÁVILA AC, RESENDE RO, GOLDBACH RW, PETERS D. **1992**. Comparative cytological and immunological labeling studies on different isolates of tomato spotted wilt virus. *Journal of Submicroscopy Cytological Pathology* 24: 1–14.
- KOMODA K, ISHIBASHI K, KAWAMURA-NAGAYA K, ISHIKAWA M. **2014**. Possible involvement of eEF1A in Tomato spotted wilt virus RNA synthesis. *Virology* 468: 81–88.
- KOO AJ, GAO X, DANIEL JONES A, HOWE GA. **2009**. A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 59: 974–986.
- KORMELINK R, GARCIA ML, GOODIN M, SASAYA T, HAENNI AL. **2011**. Negative-strand RNA viruses: The plant-infecting counterparts. *Virus Research* 162:184–202.
- KUNDU S, CHAKRABORTY D, KUNDU A, PAL A. **2013**. Proteomics approach combined with biochemical attributes to elucidate compatible and incompatible plant-virus interactions between *Vigna mungo* and mungbean yellow mosaic India virus. *Proteome Science* 11: 15.
- KYSELÁKOVÁ H, PROKOPOVÁ J, NAUŠ J, NOVÁK O, NAVRÁTIL M, ŠAFÁROVÁ D, SPUNDOVA M, LLÍK P. **2011**. Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by pea enation mosaic virus: a coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 1279–1289.

- LALIBERTÉ JF, SANFAÇON H. **2010**. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annual review of Phytopathology* 48: 69–91.
- LAMB C, DIXON RA. **1997**. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251–275.
- LAUDERT D, PFANNSCHMIDT U, LOTTSCHEICH F, HOLLANDER-CZYTKO H, WEILER EW **1996**. Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the Wrst enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Molecular Biology* 31: 323–335.
- LEASTRO MO, PALLAS V, RESENDE RO, SANCHEZ-NAVARRO JA. **2015**. The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. *Virology* 478: 39–49.
- LECHNER E, ACHARD P, VANSIRI A, POTUSCHAK T, GENSHIK P. **2006**. F-box proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 631–638.
- LIMA, MF; BARRIOLLI, CC; FONTES, MG; BOITEUX, LS; ALMEIDA, JM. **2015**. A five-year survey of tospoviruses infecting vegetable crops in main producing regions of Brazil. p. 117. *In: Book of Abstracts Xth International Symposium on Thysanoptera & Tospoviruses*. Asilomar, Pacific Grove, CA: USDA–ARS. v. 1.
- LOKESH B, RASHMI PR, AMRUTA BS, SRISATHIYANARAYANAN D, MURTHY MRN, SAVITHRI HS. **2010**. NSs encoded by *Groundnut bud necrosis virus* is a bifunctional enzyme. *PLoS One* 5(3), e9757.
- LÓPEZ-GRESA MP, LISÓN P, YENUSH L, CONEJERO V, RODRIGO I, BELLÉS JM. **2016**. Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to Citrus Exocortis Viroid and *Tomato spotted wilt virus*. *PLoS One* 11: e0166938.
- LUAN S. **2003**. Protein phosphatases in plants. *Annual Review in Plant Biology* 54: 63–92.
- MCDOWELL, JM, DANGL, JL. **2000**. Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 79–82.
- MANFRE A, GLENN M, NUNEZ A, MOREAU R, DARDICK C. **2011**. Light quantity and photosystemfunction mediate host susceptibility to turnip mosaic virus via a salicylic acid-independent mechanism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 315–327.
- MARIS PC, JOOSTEN NN, GOLDBACH RW, PETERS D. **2004**. *Tomato spotted wilt virus* infection improves host suitability for its vector *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology* 94: 706–711.
- MAYER MP. **2005**. Recruitment of Hsp70 chaperones: A crucial part of viral survival strategies. p. 1–46. *In: Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg.

- MAUCHER H, HAUSE B, FEUSSNER I, ZIEGLER J, WASTERNAK C. **2000**. Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): Tissue specific regulation in seedling development. *The Plant Journal* 21: 199–213.
- MILLER S, KRIJNSE-LOCKER J. **2008**. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature Reviews Microbiology* 6: 363–374.
- MOCHIZUKI T, OGATA Y, HIRATA Y, OHKI S.T. **2014**. Quantitative transcriptional changes associated with chlorosis severity in mosaic leaves of tobacco plants infected with cucumber mosaic virus. *Molecular Plant Pathology* 15: 242–254.
- MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, SCHAEFFER L, WOLD B. **2008**. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nature Methods* 5: 621–628.
- MUANGSAN N, BECLIN C, VAUCHERET H, ROBERTSON D. **2004**. Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *The Plant Journal* 38: 1004–1014.
- NACHAPPA P, MARGOLIES DC, NECHOLS JR, WHITFIELD AE, ROTENBERG D **2013**. *Tomato spotted wilt virus* benefits a non-vector arthropod, *Tetranychus urticae*, by modulating different plant responses in tomato. *PLoS One* 8: e75909.
- NAGY PD. **2016**. Tombusvirus-host interactions: Co-opted evolutionarily conserved host factors take center court. *Annual Review of Virology* 3: 491–515.
- NAGY PD, WANG RY, POGANY J, HAFREN A, MAKINEN K. **2011**. Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology* 411: 374–382.
- NURUZZAMAN M, SHARONI AM, KIKUCHI S. **2013**. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* 4: 248.
- PAJEROWSKA-MUKHTAR KM, MUKHTAR, MS, GUEX N, HALIM VA, ROSAHL S, SOMSSICH IE, GEBHARDT, C. **2008**. Natural variation of potato allene oxide synthase 2 causes differential levels of jasmonates and pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Planta* 228: 293–306.
- PEREIRA-CARVALHO, RC; LORENA, M; DIANESE, EC; FONSECA, MEN; BOITEUX, LS. **2014**. Melhoramento genético do tomateiro para resistência a doenças de etiologia viral. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 22: 280–361.
- POGANY J, STORK J, LI Z, NAGY PD. **2008**. In vitro assembly of the *Tomato bushy stunt virus* replicase requires the host heat shock protein 70. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:19956–19961.
- PIETERSE CMJ, VAN PELT JA, VAN WEES SCM, TON J, VERHAGEN BWM, LÉON-KLOOSTERZIEL KM, HASE S, DE VOS M, VAN OOSTEN V, POZO M, SPOEL S, VAN DER ENT S, KOORNNEEF A, CHALFUN-JÚNIOR A, RESENDE MLV, VAN LOON LC. **2005**. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para a defesa refinada. *Rundo* 13: 277–295.

PUMPLIN N, VOINNET O. **2013**. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology* 11: 745–760.

RAHOUTEI J, GARCÍA-LUQUE I, BARÓN M. **2000**. Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum* 110: 286–292.

RESENDE LV; BARRETTI PB; MEDEIROS FCL; SILVA DD; PEREIRA RB; LINS SRO; PEREIRA LM; CAMPOS MA. **2007**. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 15: 129–198.

RIBEIRO D, FORESTI O, DENECKE J, WELLINK J, GOLDBACH R, KORMELINK RJ. **2008**. *Tomato spotted wilt virus* glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. *Journal of General Virology* 89: 1811–1818.

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

RICHTER K, HASLBECK M, BUCHNER J. **2010**. The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell* 40: 253–266.

RODRÍGUEZ M, MUÑOZ N, LENARDON S, LASCANO R. **2012**. The chlorotic symptom induced by *sunflower chlorotic mottle virus* is associated with changes in redox-related gene expression and metabolites. *Plant Science* 196: 107–116.

SCHOLTHOF, KBG, ADKINS S, CZOSNEK H, PALUKAITIS P, JACQUOT E, HOHN T, SAUNDERS K, CANDRESSE T, AHLQUIST P, HEMENWAY C, FOSTER GD. **2011**. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938–954.

SCHNETTLER E, HEMMES H, HUISMANN R, GOLDBACH R, PRINS M, KORMELINK R. **2010**. Diverging affinity of *Tospovirus* RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *Journal of Virology* 84: 11542–11554.

SHARMA N, SAHU PP, PURANIK S, PRASAD M. **2013**. Recent advances in plant-virus interaction with emphasis on small interfering RNAs (siRNAs). *Molecular Biotechnology* 55: 63–77.

SHIMIZU T, SATOH K, KIKUCHI S, OMURA T. **2007**. The repression of cell wall- and plastid-related genes and the induction of defense-related genes in rice plants infected with rice dwarf virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 247–254.

SIVASANKAR S, SHELDRIK B, ROTHSTEIN SJ. **2000**. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiology* 122: 1335–1342.

SNIPPE M, WILLEM BORST J, GOLDBACH R, KORMELINK R. **2007**. *Tomato spotted wilt virus* Gc and N proteins interact *in vivo*. *Virology* 357: 115–123.

SOELLICK TR, UHRIG JF, BUCHER GL, KELLMANN JW, SCHREIER PH. **2000**. 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 of the United States of America (PNAS) 97: 2373–2378

STASWICK PE, YUEN GY, LEHMAN CC. **1998**. Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. The Plant Journal 15: 747–754.

STASWICK P, TIRYAKI I. **2004**. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. Plant Cell 16: 2117–2127.

SUGIO A, DREOS R, APARICIO F, MAULE AJ. **2009**. The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. The Plant Cell 21: 642–654.

SUZA WP, STASWICK PE. **2008**. The role of JAR1 in jasmonoyl-L-isoleucine production during Arabidopsis wound response. Planta 227: 1221–1232.

TAKEDA A, SUGIYAMA K, NAGANO H, MORI M, KAIDO M, MISE K, TSUDA S, OKUNO T. **2002**. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. FEBS Letters 532: 75–79.

TAN G, LIU K, KANG J, XU K, ZHANG Y, HU LLI C. **2015**. Transcriptome analysis of the compatible interaction of tomato with *Verticillium dahliae* using RNA-sequencing. Frontiers in Plant Science 6: 428.

THIEL H, VARRELMANN M. **2009**. Identification of *Beet necrotic yellow vein virus* P25 pathogenicity factor-interacting sugar beet proteins that represent putative virus targets or components of plant resistance. Molecular Plant Microbe Interactions 22: 999–1010.

THIEL H, HLEIBIEH K, GILMER D, VARRELMANN M. **2012**. The P25 pathogenicity factor of BNYVV targets the sugar beet 26S proteasome involved in the induction of a hypersensitive resistance response via interaction with an F-box protein. Molecular Plant-Microbe Interactions 25: 1058–1072.

THIVIERGE K, NICAISE V, DUFRESNE PJ, COTTON S, LALIBERTE JF, LE GALL O, FORTIN MG. **2005**. Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. Plant Physiology 138: 1822–1827.

TURINA M, KORMELINK R, RESENDE RO. **2016**. Resistance to tospoviruses in vegetable crops: Epidemiological and molecular aspects. Annual Review of Phytopathology 54: 15.1–15.25.

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

VAN VERK MC, HICKMAN R, PIETERSE CM, VAN WEES SC. **2013**. RNASeq: Revelation of the messengers. Trends Plant Sciences 18: 175–179.

VERCHOT J. **2012**. Cellular chaperones and folding enzymes are vital contributors to membrane bound replication and movement complexes during plant RNA virus infection. Frontiers in Plant Science 3: 275.

- VICK BA, ZIMMERMAN DC. **1987**. Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiology* 85: 1073–1078.
- VITALE A, BOSTON RS. **2008**. Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: Insights from plants. *Traffic* 9: 1581–1588.
- VOINNET O. **2009**. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669–687.
- VON BARGEN S, SALCHERT K, PAAPE M, PIECHULLA B, KELLMANN JW. **2001**. 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* 39: 1083–1093.
- WANG RY, STORK J, NAGY PD. **2009**. A key role for heat shock protein 70 in the localization and insertion of tombusvirus replication proteins to intracellular membranes. *Journal of Virology* 83: 3276–3287.
- WANG A. **2015**. Dissecting the molecular network of virus-plant interactions: the complex roles of host factors. *Annual Review of Phytopathology* 53: 45–66.
- WANG A, KRISHNASWAMY S. **2012**. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Molecular Plant Pathology* 13: 795–803
- WATERS MT, LANGDALE JA. **2009**. The making of a chloroplast. *The EMBO Journal* 28: 2861–2873.
- WASTERNAACK C, HAUSE B. **2013**. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 1116: 1021–1058.
- WEBER H, CHETELAT A, CALDELARI D, FARMER EE. **1999**. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11: 485–494.
- WHITHAM SA, QUAN S, CHANG HS, COOPER B, ESTES B, ZHU T, WANG X, HOU YM . **2003**. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Journal* 33: 271–283.
- WIJKAMP I, ALMARZA N, GOLDBACH R, PETERS D. **1995**. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85: 1069–1074.
- WITTMANN S, CHATELH, FORTINMG, LALIBERTE JF. **1997**. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234: 84–92.
- WU L, WANG S, CHENX, WANG X, WU L, ZU X, CHEN Y. **2013**. Proteomic and phytohormone analysis of the response of maize (*Zea mays* L.) seedlings to sugarcane mosaic virus. *PLoS One* 8: e70295.

YAMANAKA T, IMAI T, SATOH R, KAWASHIMA A, TAKAHASHI M. **2002**. Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *Journal of Virology* 76: 2491–2497.

YE C, DICKMAN MB, WHITHAM SA, PAYTON M, VERCHOT J. **2011**. The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. *Plant Physiology* 156: 741–755.

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

CAPÍTULO III

Espectro de eficiência e especificidade da resistência da cultivar ‘Rey de Los Tempranos’ (‘PI 203230’) e da linhagem ‘LAM 147’ (gene *Sw-5*) contra diferentes espécies/isolados de *Tospovirus*.

RESUMO

Os tospovírus estão entre os agentes virais de maior importância para a agricultura mundial, provocando perdas em várias grandes culturas e hortaliças, incluindo o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Do ponto de vista prático, apenas o locus *Sw-5* (introgridido da espécie selvagem *S. peruvianum*) tem sido amplamente empregado no melhoramento genético do tomateiro para resistência a tospovírus. Entretanto, o uso contínuo de híbridos resistentes tem aumentado a pressão de seleção sobre esse grupo de patógenos, levando ao aparecimento de isolados capazes de ‘quebrar’ a resistência mediada por esse gene. Uma estratégia para minimizar a pressão de seleção a favor de isolados que superam o gene *Sw-5* é diversificar os fatores de resistência empregados no desenvolvimento de materiais comerciais. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o espectro da resistência da cultivar ‘Rey de los Tempranos’ (‘PI 203230’), que foi previamente identificada como sendo uma fonte alternativa e promissora contra alguns isolados de *Tospovirus*. A caracterização da resistência em ‘PI 203230’ foi conduzida através da inoculação mecânica de plântulas com 22 isolados de tospovírus do Brasil e da Califórnia (EUA) distribuídos dentro das três principais espécies que infectam o tomateiro (sete isolados de *Groundnut ringspot virus* – GRSV, um isolado de *Tomato chlorotic spot virus* – TCSV e 14 isolados de *Tomato spotted wilt virus* – TSWV). A linhagem ‘LAM 147’ (portadora do gene *Sw-5* em homozigose) também foi avaliada para verificar a presença no Brasil de isolados de TSWV capazes de superar essa fonte de resistência. A cv. ‘Santa Clara’ (linhagem isogênica ‘LAM 147’) foi utilizada como

controle suscetível em todos os ensaios. Análise de sequência dos genes codificadores das proteínas NSm e N foram conduzidas visando a confirmação da espécie viral e também a potencial identificação de fatores de avirulência em isolados de TSWV contrastantes para a capacidade de infectar o acesso ‘PI 203230’. Os resultados obtidos indicaram que a resistência do acesso ‘PI 203230’ se caracteriza como sendo do tipo espécie-específica (funciona somente contra isolados de TSWV) e isolado-específica (alguns isolados de TSWV são capazes de ‘quebrar’ a resistência). Nenhum dos isolados de TSWV infectou de maneira sistêmica a linhagem ‘LAM 147’, sendo que apenas os isolados #501, #003 e #160 induziram uma resposta de hipersensibilidade. Plantas híbridas (F₁) resultante de cruzamentos realizados entre ‘PI 203230’ x ‘Santa Clara’ (inoculadas com o isolado TSWV #523) não exibiram sintomas, indicando que a resistência para essa variante viral seria condicionada por fator(es) dominante(s). As análises de polimorfismos dos genes codificadores das proteínas N e NSm indicaram que os isolados de TSWV contrastantes (i.e. virulentos versus não virulentos em ‘PI 203230’) compartilham altos níveis de similaridade. Além disso, não foram identificados polimorfismos específicos para os isolados contrastantes (virulentos vs. avirulentos em ‘PI 203230’). Estes resultados sugerem que nenhuma das duas proteínas representa ser o potencial fator de avirulência viral responsável por desencadear a resposta de resistência do acesso ‘PI 203230’.

Palavras chaves: Tomateiro, TSWV, tospovírus, resistência isolado-específica.

ABSTRACT

The tospovirus are among the most important viral pathogens to world agriculture, causing yield and quality losses in several field and vegetable crops, including tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). From a practical stand point, only the resistance conferred by the locus *Sw-5* (introgressed from the wild species *S. peruvianum*) has been widely used in tomato breeding programs for tospovirus resistance. However, the continuous use of resistant hybrids has increased the selection pressure on this group of pathogens, leading to the emergence of isolates able to overcome the resistance mediated by *Sw-5* gene. In this context, the present work aimed to study the spectrum of efficiency of the resistance against *Tospovirus* species/isolates of the accession ‘Rey de los Tempranos’ (=‘PI 203230’), which was identified as a promising alternative source for tomato breeding programs. The resistance of ‘PI 203230’ was characterized by mechanical inoculation of seedlings with 22 tospovirus isolates from Brazil and California (USA), belonging to the three main tomato-infecting species (seven isolates of *Groundnut ringspot virus* – GRSV, one isolate of *Tomato chlorotic spot virus* – TCSV and 14 *Tomato spotted wilt virus* – TSWV isolates). The species identity was confirmed via PCR using specific primers for the N protein for each isolate. Plants of the inbred line ‘LAM 147’ (carrying the *Sw-5* gene in homozygous condition) were also evaluated aiming to verify the presence of Brazilian TSWV isolates able to overcome this source of resistance. The cultivar ‘Santa Clara’ (an isogenic line of ‘LAM 147’) was employed as susceptible control in all assays. The results indicated that the resistance of ‘PI 203230’ is characterized as being species-specific (i.e. it is effective only against TSWV isolates) and isolate-specific (i.e. some TSWV isolates were able to break down the resistance). None of the 14 TSWV isolates induced symptoms in ‘LAM 147’. The TSWV isolates #501, #003 and #160 induced hypersensitive responses (HR) in the resistant line ‘LAM 147’. Hybrid plants (F_1) from the cross between ‘PI 203230’ x ‘Santa Clara’ were

inoculated with the isolate TSWV #523 and did not exhibit symptoms, indicating that the resistance to this virus strain could be conferred by dominant factor(s). The analyses of polymorphisms within the genes coding for the viral proteins N and NSm indicated that contrasting TSWV isolates (i.e. virulent vs. avirulent to 'PI 203230') displayed high levels of identity. In addition, no mutation specific to either virulent or avirulent isolates were found. These overall suggesting that none of these two proteins is the potential avirulence factor that triggers the resistance response in the accession 'PI 203230'.

Keywords: Tomato, TSWV, tospovirus, isolate-specific resistance.

INTRODUÇÃO

Os tospovírus estão entre os agentes virais de maior importância para a agricultura mundial, provocando perdas consideráveis em várias grandes culturas e, sobretudo, em hortaliças (**Goldbach & Peters, 1994; Scholthof et al., 2011**). A espécie tipo do gênero é o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Espécies de *Tospovirus* são naturalmente transmitidos por várias espécies de tripes (Ordem Thysanoptera; família Thripidae) em uma maneira circulativa-propagativa (**Wijkamp et al., 1995**).

A gama de hospedeiros de tospovírus varia de acordo com o isolado, com a espécie viral e com a presença de fatores de resistência em acessos da planta hospedeira. O TSWV apresenta a maior número de hospedeiros, sendo registrado infectando mais de 900 espécies, tanto dicotiledôneas como monocotiledôneas em mais de 90 famílias botânicas (**Pappu et al., 2009**). As espécies relatadas infectando o tomateiro no Brasil são TSWV (**Costa & Forster, 1941**); *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) (**Duarte et al., 1995**); *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) (**Nagata et al., 1998**) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (**Lima et al., 2015**).

As espécies que compõem o gênero *Tospovirus* (recentemente reclassificado para o gênero *Orthotospovirus*, família *Tospoviridae*, ordem *Bunyvirales* – [ICTV, 2017](#)), possuem partículas virais esféricas envolvidas por uma membrana lipídica (derivada da planta hospedeira) com diâmetro de 80-120 nm, denominada envelope. Associadas a essa membrana estão as glicoproteínas Gn e Gc, responsáveis pela interação do vírus com seu vetor, determinando a capacidade de transmissão e a especificidade ([Ullman et al., 2005](#); [Wijkamp et al., 1995](#)). A parte interna da partícula é composta pelo genoma viral encapsidado pela proteína N (nucleocapsídeo) e cerca de 10-20 cópias da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) ([Van Poelwuk et al., 1993](#)). O genoma dos tospovírus consiste de três segmentos de RNA denominados de acordo com o seu tamanho. O RNA L (= *large*) apresenta polaridade negativa e codifica a proteína estrutural RdRp. O RNA M (= *medium*) é ambisense e codifica a proteína não estrutural NSm (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) na orientação senso positivo e os precursores das glicoproteínas (Gn & Gc) no sentido negativo. O RNA S (= *small*) é ambisense e codifica a proteína não-estrutural NSs (supressora do silenciamento gênico) na orientação senso positivo e a proteína N na orientação senso negativo ([De Ávila, 1992](#), [Takeda et al., 2002](#), [Bucher et al., 2003](#), [Snippe et al., 2007](#)).

Até o momento, apenas dois genes dominantes de resistência contra tospovírus têm sido amplamente empregados em variedades comerciais de hortaliças ([Turina et al., 2016](#)). O gene da espécie de tomateiro selvagem *S. peruvianum* L., denominado Sw-5 ([Stevens et al., 1991](#); [Boiteux & Giordano, 1993](#)) e o gene dominante oriundo da espécie de pimenta *Capsicum chinense* Jacq. ([Cheng et al., 1989](#); [Boiteux et al., 1993](#)), que foi posteriormente identificado pela sigla Tsw ([Boiteux & De Ávila, 1994](#)).

O locus Sw-5 foi mapeado na região telomérica do cromossomo 9 do tomateiro e foi isolado via clonagem posicional ([Brommonschenkel et al., 2000](#)). Análises estruturais

revelaram que o alelo resistente codifica uma proteína da classe CC-NB-LRR (**Brommonschenkel et al., 2000**). Estudos adicionais mostraram que esse gene reside dentro de um complexo (*cluster*) formado por cinco cópias supostamente oriundas de um mesmo gene ancestral, denominadas de *Sw-5a* até *Sw-5e* (**Spasova et al., 2001**). Estudos adicionais indicaram que o *Sw-5b* é a cópia funcional e suficiente para conferir resistência contra uma ampla gama de tospovírus, incluindo as principais espécies que comumente infectam o tomateiro (TSWV, GRSV, TCSV e CSNV) bem como uma espécie viral taxonomicamente mais divergente – *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (**Spasova et al., 2001; Dianese et al., 2011; Hallwass et al., 2014**).

Embora o gene *Sw-5* seja o mais amplamente utilizado no melhoramento genético do tomateiro, os primeiros estudos voltados à resistência ao TSWV identificaram fontes promissoras em acessos de *S. pimpinellifolium* (**Samuel et al., 1930**) e no acesso *S. lycopersicum* ‘Rey de los Tempranos’ (**Holmes, 1948**). Estudos genéticos conduzidos por **Finlay (1953)** indicaram a natureza complexa da resistência de ‘Rey de los Tempranos’, envolvendo a ação conjunta de dois genes dominantes (*Sw-1^a* e *Sw-1^b*) e três genes recessivos (*sw-2*, *sw-3* e *sw-4*). No Brasil, seleções da variedade ‘Rey de los Tempranos’ se mostraram fontes promissoras para resistência contra isolados brasileiros de tospovírus em avaliações de coleções de germoplasma de *Solanum* (sect. *Lycopersicon*) conduzidas em campo aberto (**Maluf et al., 1991**) e telado (**Dianese et al., 2011**).

O uso contínuo de híbridos contendo os genes *Sw-5* e *Tsw* representa um fator de pressão de seleção favorecendo o surgimento de isolados de *Tospovirus* capazes de superar essas fontes de resistência. De fato, já existem relatos de isolados de GRSV no Brasil (**Boiteux & Nagata, 1993; Boiteux & De Ávila, 1994**) e isolados de europeus, chineses e australianos de TSWV capazes de quebrar a resistência mediada pelo gene *Tsw* (**Latham & Jones, 1998; McMichael et al., 2002; Jiang et al., 2016**). Isolados europeus de TSWV

também foram descritos superando a resistência mediada pelo gene *Sw-5* (Aramburu & Marti, 2003; Ciuffo *et al.*, 2005). No entanto, ainda não existem relatos de isolados capazes de quebrar a resistência conferida pelo gene *Sw-5* nas condições brasileiras.

Uma estratégia para minimizar a pressão de seleção a favor de isolados que superam o gene *Sw-5* é diversificar os fatores de resistência empregados no desenvolvimento de materiais comerciais. Neste contexto, os dois principais objetivos do presente trabalho foram: (1) estudar o espectro de eficiência e a especificidade da resistência contra distintas espécies/isolados de *Tospovirus* na cultivar ‘Rey de los Tempranos’, uma fonte alternativa de resistência a esse grupo de patógenos do tomateiro e (2) verificar se dentro de uma coleção de 14 isolados de TSWV já existem alguns capazes de ‘quebrar’ a resistência conferida pelo gene *Sw-5*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização dos ensaios – Os ensaios foram realizados em casa de vegetação, no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular e Laboratório de Genômica da Embrapa Hortaliças (Brasília–DF). Uma parte desse estudo foi conduzida na Universidade da Califórnia, Campus de Davis (UCDavis).

Isolados virais – A coleção de isolados de espécies de *Tospovirus* empregada no presente estudo está descrita na **Tabela 1**. Foram utilizados 22 isolados virais coletados em diferentes locais no Brasil e em diferentes localidades da Califórnia, EUA (Sutter, Fresno e Madalena). A coleção incluiu isolados virais classificados dentro das três principais espécies que infectam o tomateiro (sete isolados de GRSV, um isolado de TCSV e 14 isolados de TSWV). Foram considerados como isolados diferentes aqueles obtidos de plantas hospedeiras distintas e/ou

em diferentes locais de cultivos. Os isolados foram mantidos em *ultra-freezer* (-80° C), para preservação da integridade do inóculo original.

Preparo do inóculo – Para o preparo do inóculo foram utilizadas plantas de *Datura stramonium*, *Nicotiana rustica* e *N. tabacum* ‘TNN’ como multiplicadoras do vírus. O acesso *C. chinense* ‘PI 159236’ quando inoculado com isolados de TSWV produz o fenótipo de reação de hipersensibilidade (HR) devido à presença do gene *Tsw*, o qual confere resistência específica ao TSWV. Isolados das espécies GRSV e TCSV induzem sintomas sistêmicos e necróticos no ‘PI 159236’. Assim esse acesso é amplamente utilizado como planta indicadora de TSWV. As plantas multiplicadoras foram mecanicamente inoculadas com os 22 isolados de tospovírus 15 dias antes da inoculação nas plantas de tomateiro a serem testadas. O tampão de inoculação foi preparado utilizando-se fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) 0,01 M e sulfito de sódio (Na_2SO_3) 1% (P-V) em água destilada, pH 7,0. A mesma metodologia foi utilizada para o experimento conduzido na UC–Davis.

Tabela 1 – Identificação e local de origem dos isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) inoculados em plantas do acesso ‘Rey de Los Tempranos’ e na linhagem ‘LAM 147’ (homozigota para o gene *Sw-5*).

Espécie viral /Isolados	Origem	Hospedeira original
GRSV – ToSP	Holambra (SP)	Tomate
GRSV – ToRAJ1	Rajadinha (DF)	Tomate
GRSV – ToRAJ2	Rajadinha (DF)	Tomate
GRSV – ToRAJ3	Rajadinha (DF)	Tomate
GRSV – ToRAJ7	Rajadinha (DF)	Tomate
GRSV – ToFR	CNPH (DF)	Tomate
GRSV – Alf-3	Rajadinha (DF)	Alface
TCSV – TCSV	CNPH (DF)	Tomate
TSWV – #523	Guaíra (SP)	Tomate
TSWV – #508	CNPH (DF)	Tomate
TSWV – Sutter	Sutter (Califórnia)	Tomate
TSWV – MR1	Madalena (Califórnia)	Tomate

TSWV – Fresno	Fresno (Califórnia)	Tomate
TSWV – #003	Ceilândia (DF)	Tomate
TSWV – #029	Ceilândia (DF)	Tomate
TSWV – #030	Ceilândia (DF)	Tomate
TSWV – #140	CNPH (DF)	Tomate
TSWV – #143	CNPH (DF)	Tomate
TSWV – #501	CNPH (DF)	Tomate
TSWV – #160	CNPH (DF)	Tomate
TSWV – #199	CNPH (DF)	Tomate
TSWV – #200	CNPH (DF)	Tomate

Materiais genéticos de tomateiro avaliados para resposta a tospovírus – O acesso ‘Rey de Los Tempranos’ (= ‘RLT’) foi obtido da Austrália e já havia sido previamente avaliado por **Dianese et al. (2011)**, que demonstraram a resistência contra isolados de tospovírus. Plantas da linhagem resistente ‘LAM 147’ (portadora do gene *Sw-5* em homozigose) também foram avaliadas para verificar se estes isolados seriam capazes de superar essa fonte de resistência. A natureza homozigota da linhagem ‘LAM 147’ foi demonstrada através de reações de PCR com um marcador funcional codominante descrito por **Dianese et al. (2010)**. A cv. ‘Santa Clara’ (isolinha da linhagem ‘LAM 147’) foi utilizada como controle suscetível.

Preparo das mudas e inoculação de ‘Rey de Los Tempranos’, ‘Santa Clara’ e ‘LAM 147
– Sementes do acesso ‘RLT’, da linhagem ‘LAM 147’ e da variedade suscetível ‘Santa Clara’ foram semeadas em bandeja de 128 células contendo substrato Plantmax[®]. Aos 21 dias após a germinação, as plantas foram transplantadas para vasos de 1,5 litros de capacidade contendo solo autoclavado. Plantas de tomateiro com dois pares de folhas verdadeiras foram polvilhadas com *Carborundum* (400 mesh) e em seguida, todas as folhas foram mecanicamente inoculadas. O inóculo foi preparado utilizando-se 1 g de folhas sintomáticas de *D. stramonium*, previamente inoculadas e maceradas em 10 mL de tampão de inoculação contendo fosfato de sódio (NaH₂PO₄H₂O) 0,02 M e sulfito de sódio (Na₂SO₃) 1% (P-V) em água destilada, pH 7,0. Em seguida, as plantas inoculadas foram lavadas para retirar o excesso

de *Carborundum* e evitar a queima das folhas. Após 48 horas foi feita uma segunda inoculação seguindo o mesmo método, procurando-se, dessa forma, reduzir significativamente o nível de escapes. Plantas inoculadas apenas com extrato foliar de plantas saudáveis (*mock*-inoculadas) e plantas não inoculadas foram utilizadas como controle. A cultivar ‘Santa Clara’ foi utilizada como controle suscetível e plantas de fumo (*N. rustica* e *N. tabacum* cv. TNN) foram utilizadas como controle da inoculação.

O experimento foi conduzido em duas etapas: primeiramente testaram-se os isolados de GRSV, TCSV e dois isolados de TSWV (#508 e #523). A partir dos resultados obtidos um segundo grupo de experimentos foi realizado para avaliar a resistência de ‘RLT’ com mais refinamento, utilizando uma gama mais ampla de isolados de TSWV.

Obtenção, identificação e inoculação de plantas híbridas oriundas do cruzamento entre ‘Santa Clara’ x ‘Rey de Los Tempranos’ – Com base nos resultados obtidos na primeira etapa do experimento foram realizados cruzamentos entre o parental resistente ‘RLT’ (usado como genitor masculino) e a cultivar suscetível ‘Santa Clara’ (utilizada como genitor feminino), visando iniciar a obtenção de populações segregantes para futuros estudos de herança. As plantas híbridas (F₁) resultante de cruzamentos entre ‘RLT’ x ‘Santa Clara’ foram inoculadas com o isolado TSWV #523 para estudos de herança da resistência. A confirmação da natureza híbrida dos indivíduos F₁ foi realizada via PCR utilizando *primers* do tipo RAPD (*‘Random Amplified Polymorphic DNA’*) previamente selecionados por se apresentarem polimórficos entre os dois parentais contrastantes.

Avaliação das respostas dos acessos inoculados aos isolados de tospovírus – Todos os acessos foram avaliados a partir dos cinco dias após a inoculação através da observação dos sintomas. Decorridos 25 dias após a segunda inoculação, todas as plantas foram submetidas

ao teste sorológico (ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*), incluindo as plantas sintomáticas e assintomáticas. Foram consideradas como resistentes, as plantas que não exibiram sintomas e que apresentaram reação negativa contra os antissoros para as espécies virais testadas em ELISA.

Caracterização da espécie viral – Os isolados utilizados foram testados para a confirmação da espécie viral através da inoculação em um círculo de plantas hospedeiras, teste sorológico (ELISA) e RT-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando *primers* específicos para cada espécie, com exceção dos isolados provenientes de Fresno e Madalena (Califórnia) que não foram analisados via RT-PCR.

Amplificação do gene codificador da proteína N – A identidade dos isolados foi confirmada através da PCR utilizando *primers* específicos para a proteína N. Para isto foi realizada a extração de RNA total para cada isolado a partir de amostras foliares e/ou frutos de tomate sintomáticos utilizando-se TRIzol[®] (Ambion), conforme as instruções do fabricante. O RNA total foi utilizado como molde para a transcrição reversa e amplificação por PCR. Para a transcrição reversa foi utilizada a enzima M-MLV *reverse transcriptase* (Promega) e o *primer* J13 (5'-CCC-GGA-TCC-AGA-GCA-AT-3') (Cortez *et al.*, 2001) que possui oito nucleotídeos conservados presentes nas terminações dos três RNAs virais para a amplificação completa dos segmentos S e M. Os isolados de *Tospovirus* foram classificados em nível de espécie utilizando os *primers* específicos para a proteína N de TSWV, GRSV e TCSV (Tabela 2).

Amplificação do gene codificador da proteína NSm – Foram também conduzidos ensaios via PCR utilizando *primers* específicos para a proteína NSm (Tabela 2), tendo como molde o

cDNA obtido de um subgrupo de isolados de TSWV que apresentaram fenótipos contrastantes em relação ao acesso ‘RLT’ (infecção vs. não infecção). A reação de PCR foi composta de 2 µL de cDNA; 2,0 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3); 1,6 µL de MgCl₂ (50mM); 1,6 µL de dNTPs (2,5 mM cada); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5u/µL); 0,2 µL de primer; 12,2 µL de H₂O Milli-Q com volume final de 20,0 µL. As amplificações foram efetuadas em um termociclador Gene Amp® PCR System 9700. O programa utilizado para amplificação dos fragmentos foi de um ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de: 35 ciclos de 94°C por 45 seg para a desnaturação, 56°C por 1 min para anelamento, e 72°C por 1 min para extensão, o ciclo final constituiu-se 72° por 7 min e 4°C por tempo indeterminado (∞). Os produtos da PCR foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta, utilizando-se o marcador 1 Kb Plus DNALadder® (Invitrogen) para análise dos produtos obtidos.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* para identificação específica de isolados de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV); *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV) usados no presente estudo.

Espécie viral	Proteína	Senso (5'- 3')	Antisenso (5'- 3')	Tamanho do fragmento
TSWV	N	GCTGGAGCTAAGTATAGC	CACAAGGCAAAGACCTTGAG	620pb
	NSm	CCGAAGTCCGAATCGAAG	ACGCAAGTCAGCAGTAACT	720pb
TSWV (CA)*	N	ATGTCTAAGGTTAAGCTCAC	TTAAGCAAGTTCTGTGAGTT	777pb
	NSm	AGAGCAATCAGTGCATCAGAA	GACCAAAGTTTGGCTTTTCAGC	1200pb
GRSV	N	AGAGCTTCCTTAGTGTGTAAGTCTAG	GAAAGGTCTAGATCTAAACTGCCAC	600pb
TCSV	N	CTCGGTTTTCTGCTTTTC	CGGACAGGCTGGAGAAATCG	290pb

* *Primer* usado para PCR do isolado obtido de Sutter, Califórnia (EUA).

Análise de sequência dos genes codificadores das proteínas NSm e N visando a potencial identificação de fatores de avirulência em isolados de TSWV contrastantes para a capacidade de infectar o acesso ‘RLT’ – Os produtos da PCR obtidos para todos os isolados foram diretamente sequenciados utilizando os *primers* específicos para cada espécie viral de

acordo com o resultado da PCR. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI PRISM 3100 do Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças (CNPq), utilizando o Kit ABI Prism BigDye® version 3.1 (Applied Biosystems do Brasil). A análise da qualidade das sequências, remoção dos segmentos de baixa qualidade (Alex, 1999) e a obtenção das sequências consenso foram realizadas no programa SeqMan® (Lasergene, Madison, Wisconsin-WI). As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank, empregando algoritmo Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O alinhamento foi obtido utilizando o *plugin* do algoritmo *muscle* presente no programa Geneious R (Kearse et al., 2012). Após a análise das sequências foram feitos alinhamentos múltiplos das sequências das proteínas N e NSm de um subgrupo de isolados de TSWV utilizados neste estudo. O objetivo dessa análise foi verificar se a presença de mutações ou polimorfismos específicos dentro desses dois genes seria correlacionada com a capacidade de infectar ou não o acesso ‘RLT’. O alinhamento foi obtido com o *plugin* do algoritmo *muscle* no programa Geneious R (Kearse et al., 2012) usando os parâmetros do programa. A partir do alinhamento foi gerado uma matriz de identidade das proteínas N e NSm dos isolados de TSWV.

RESULTADOS

O espectro e a especificidade da resistência da cv. ‘Rey de Los Tempranos’ (‘RLT’) e ‘LAM 147’ foi estimada através de bioensaios empregando a inoculação mecânica com uma coleção de isolados/espécies de *Tospovirus*. **Resposta do acesso ‘RLT’** – Na primeira etapa do experimento foi verificado que os isolados TSWV #523 e TSWV #508 não foram capazes de induzir sintomas na cv. ‘RLT’, mas induziram sintomas típicos na cultivar suscetível ‘Santa Clara’. Embora tenha sido observada reação de resistência em ‘RLT’ contra esses dois isolados, não foi verificada a ocorrência de lesões locais, características da resposta de

hipersensibilidade (HR) nas folhas de ‘RLT’ inoculadas. A ausência do vírus nas plantas resistentes inoculadas foi comprovada pelo teste sorológico (ELISA) (**Tabela 3**). Embora os isolados de TSWV não tenham induzido sintomas em ‘RLT’ foi verificado que o isolado de TCSV e todos os isolados de GRSV, com exceção do isolado ToRAJ3, foram capazes de induzir sintomas severos em ‘RLT’. As plantas inoculadas com o isolado GRSV ToRAJ3 não exibiram sintomas típicos de tospovirose em ‘RLT’, possivelmente devido a problemas de escape ou perda de virulência do patógeno, uma vez que este também não induziu sintomas no controle suscetível (cv. ‘Santa Clara’) (**Tabela 3**). Os primeiros sintomas característicos da infecção por tospovírus foram visualizadas aos oito dias após a inoculação com os isolados de GRSV tanto na cv. ‘Santa Clara’ como no acesso ‘RLT’, os quais se caracterizavam como clorose moderada e curvatura do ápice foliar. Com o decorrer da infecção estes sintomas evoluíram para manchas cloróticas e/ou necróticas em formato de anéis concêntricos, necrose apical e bronzeamento, visualizados aos 15 dias após a inoculação (DPI). Após verificar a ocorrência de resistência específica apenas contra os isolados de TSWV, o experimento foi repetido apenas com os isolados #508 e #523, os quais novamente induziram sintomas apenas na cv. ‘Santa Clara’.

Avaliação de ‘RLT’ e ‘LAM 147’ contra uma coleção de isolados de TSWV– Com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores, a avaliação da resistência de ‘RLT’ foi expandida empregando uma coleção mais ampla de isolados de TSWV. Nesta segunda etapa foram utilizados dez isolados brasileiros de TSWV, incluindo o isolado #523 e três isolados norte-americanos (**Tabela 1**). Nesta etapa também foi incluída a linhagem ‘LAM 147’ (homozigota para o gene *Sw-5*), com o intuito de verificar a presença de potenciais isolados de TSWV capazes de ‘quebrar’ a resistência desta fonte. Neste ensaio os primeiros sintomas foram visualizados aos oito dias após a inoculação (DAI) nas plantas de fumo utilizadas como

controle da inoculação (*N. rustica* e *N. tabacum* cv. TNN) e na cv. ‘Santa Clara’ (**Figura 3**). Nesta primeira avaliação (oito DAI) todos os isolados induziram sintomas em plantas de fumo com exceção dos isolados #030 e #143, e apenas os isolados #140 e #501 não haviam induzido sintomas na cv. ‘Santa Clara’. Nenhuma planta de ‘RLT’ inoculada com os isolados de TSWV exibiu sintomas nessa primeira avaliação. Nenhum dos isolados de TSWV infectou de maneira sistêmica a linhagem ‘LAM 147’. No entanto, os isolados #501, #003 e #160 foram capazes de induzir lesões locais necróticas nessa linhagem, resultando em uma reposta do tipo hipersensibilidade (HR) (**Figura 1**).

Na segunda avaliação (15 DPI) foi verificado que alguns isolados induziram sintomas em plantas de ‘RLT’, incluindo os isolados #501, #003 e #199. Entretanto, estes eram sintomas iniciais como mosqueado, clorose e pequenos pontos necróticos que não se assemelhavam aos anéis concêntricos característicos de tospovirose. Neste período, todos os isolados de TSWV já haviam induzido sintomas nos controles, entretanto ocorreram alguns escapes em plantas da cv. ‘Santa Clara’ e nem todas as plantas inoculadas exibiram sintomas (**Tabela 3**).

Na última avaliação realizada aos 22 DPI foi verificado que os isolados #523, #200, #143, #140, #160, #029 e #030 não induziram sintomas de tospovirose em nenhuma das plantas de ‘RLT’. Os demais isolados foram capazes de infectar e induzir sintomas em ‘RLT’ (#501, #003 e #199). O isolado #199 induziu sintomas em 50% e 60 % das plantas de ‘RLT’ e ‘Santa Clara’, respectivamente. O isolado #003 induziu sintomas em 73% das plantas inoculadas de ‘RLT’, sendo considerado o mais agressivo, pois foi um dos primeiros isolados a induzir sintomas no controle suscetível (cv. ‘Santa Clara’) e também provocou sintomas mais severos em ‘RLT’ quando comparado com os demais isolados (**Figura 1**). O isolado #140 não induziu sintomas nas plantas de ‘RLT’ e apenas uma planta da cv. ‘Santa Clara’ foi positiva para o vírus. Entretanto, as plantas de fumo usadas como controle da inoculação

exibiram sintomas típicos da doença, indicando que, embora tenha ocorrido escape no controle suscetível (cv. ‘Santa Clara’), o vírus permaneceu viável. Todas as plantas que exibiram sintomas de tospovirose apresentaram reação positiva contra o antissoro para TSWV pelo teste sorológico (ELISA). As plantas da linhagem resistente ‘LAM 147’ não exibiram nenhum sintoma característico de infecções por TSWV e também apresentaram reação negativa por meio do teste ELISA.

Avaliação da resposta de ‘RLT’ e ‘LAM 147’ contra três isolados de TSWV da Califórnia (EUA) – As plantas de ‘RLT’ inoculadas com os isolados californianos de TSWV foram suscetíveis. Os primeiros sintomas visualizados em plantas de ‘RLT’ foram observados aos 10 DPI apenas nas plantas inoculadas com o isolado ‘Sutter’. Os demais isolados induziram sintomas a partir dos 15 DPI. Vale ressaltar que inicialmente foi questionada se os sintomas exibidos seriam induzidos por tospovírus, pois estes não correspondiam aos sintomas característicos de tospovirose. Inicialmente foram visualizadas pequenas manchas escuras nas folhas, que progrediram para manchas maiores que se estenderam até a região do caule induzindo uma espécie de rachadura (**Figura 1**). Dessa forma, foram feitos testes sorológicos para outros grupos de vírus como potyvirus e *Tobacco mosaic virus* (TMV) para detectar a ocorrência de infecções mistas, entretanto os resultados foram positivos apenas para TSWV.

Tabela 3 – Reação da cv. ‘Rey de Los Tempranos’ (RLT), ‘LAM 147’ (linhagem homozigota para o gene *Sw-5*) e cv. ‘Santa Clara’ após inoculação com diferentes isolados de *Tomato spotted wilt virus*, *Groundnut ringspot virus* e *Tomato chlorotic spot virus*.

Isolados	Nº de plantas com sintomas/Nº total de plantas inoculadas		
	‘RLT’	‘Santa Clara’	‘LAM 147’
GRSV – ToSP	9/9	9/9	NA
GRSV – ToRAJ1	9/9	9/9	NA
GRSV – ToRAJ2	7/9	9/9	NA
GRSV – ToRAJ3	0/9	0/9	NA
GRSV – ToRAJ7	9/9	9/9	NA
GRSV – ToFR	9/9	9/9	NA
GRSV – Alf-3	9/9	9/9	NA
TCSV – TCSV	9/9	9/9	NA
TSWV – #523*	0/21	16/17	0/5
TSWV – #508	0/9	9/9	0/5
TSWV – Sutter	9/9	9/9	0/9
TSWV – MR1	9/9	9/9	0/9
TSWV – Fresno	9/9	9/9	0/9
TSWV – #030	0/12	3/8	0/5
TSWV – #140	0/12	1/8	0/5
TSWV – #143	0/12	8/8	0/5
TSWV – #160	0/12	5/8	0/5
TSWV – #200	0/12	3/8	0/5
TSWV – #029	0/12	2/8	0/5
TSWV – #501	4/12	4/8	0/5
TSWV – #199	6/12	8/8	0/5
TSWV – #003	8/11	7/8	0/5

* Isolado avaliado nas duas etapas do experimento.

** NA = não avaliado



Figura 1 – Sintomas induzidos por *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em ‘Rey de Los Tempranos’(= ‘RLT’), cultivar ‘Santa Clara’ e *Nicotiana rustica*. **A, B & C** = plantas de ‘RLT’ inoculadas com o isolado TSWV #003 exibindo sintomas severos da infecção. **D, E & F** = plantas de ‘RLT’ inoculadas com o isolado californiano ‘Sutter’. **G** = reação de hipersensibilidade induzida pelo isolado TSWV #003 na linhagem resistente ‘LAM 147’. **H** = Plantas da cultivar ‘Santa Clara’ inoculadas com o isolado TSWV#523. **I** = Sintomas típicos de tospovirose induzido pelo isolado TSWV #003 em *N. rustica*.

Avaliação de plantas F₁ resultantes do cruzamento ‘Santa Clara’ x ‘RLT’ contra uma coleção de isolados de TSWV do Brasil – As plantas da geração F₁ inoculadas com o isolado TSWV #523 não exibiram nenhum sintoma típico de tospovirose, enquanto todas as plantas da cv. ‘Santa Clara’ exibiram sintomas severos da doença, mostrando a viabilidade do inóculo para causar infecção (**Figura 2**) e indicando que esta seria uma resistência conferida por um único gene dominante (monogênica), entretanto, resultados conclusivos só serão possíveis a partir do estudo de herança com populações segregantes incluindo plantas F₂ e plantas resultantes de retrocruzamentos (parentais x F₁). O *primer* A16 da coleção de RAPDs foi o que melhor representou a presença de segmentos genômicos do parental resistente em diferentes plantas F₁ (**Figura 3**).



Figura 2 – Avaliação da resistência de plantas da geração F₁ (resultantes do cruzamento ‘Santa Clara’ x ‘Rey de Los Tempranos’) contra *Tomato spotted wilt virus*. **A** = Plantas da cv. ‘Santa Clara’ exibindo sintomas da infecção pelo isolado TSWV #523. **B** = Ausência de sintomas nas plantas F₁ após a inoculação com o isolado TSWV #523.

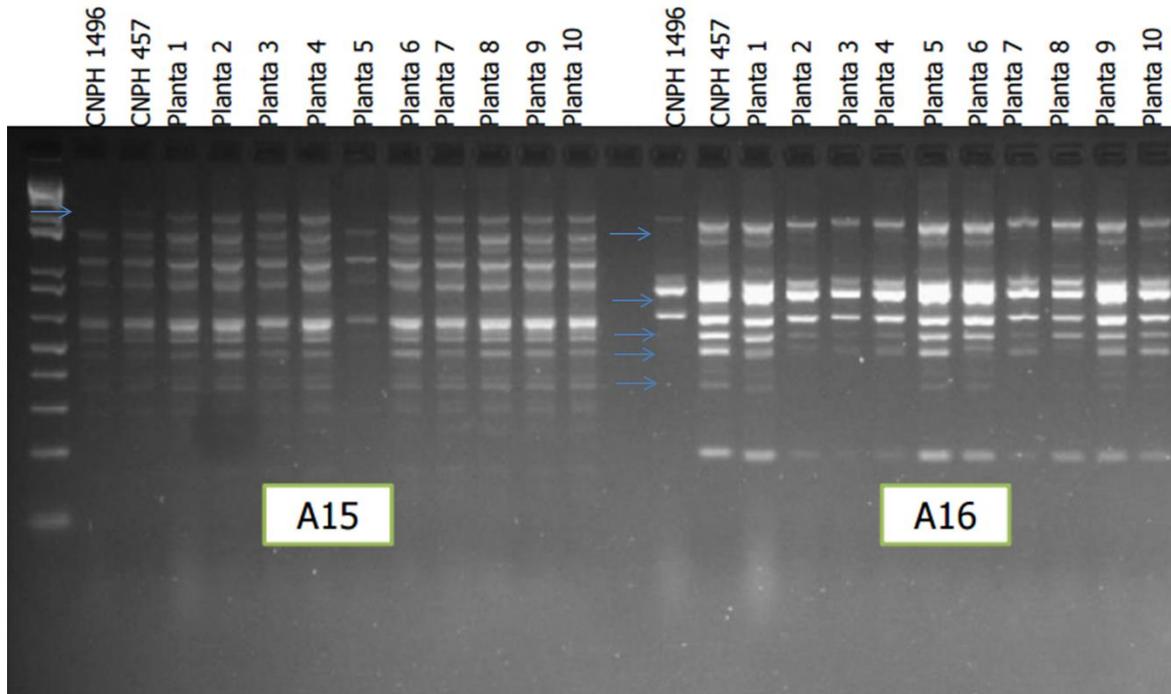


Figura 3 – Perfil de amplicons RAPD dos parentais resistente (‘Rey de los Tempranos’ – ‘RLT’) e suscetível (cv. ‘Santa Clara’) e de potenciais plantas F₁ para confirmação da introgressão das características de ‘RLT’ nas plantas híbridas resultante dos cruzamentos entre ‘RLT’ x ‘Santa Clara’. As setas em azul indicam o polimorfismo detectado pelos *primers* A15 e A16. O *primer* A16 foi o mais eficiente em detectar polimorfismos e demonstrar o sucesso da introgressão de fatores de ‘RLT’ nas plantas F₁.

Análise comparativa das sequências nucleotídicas correspondendo aos genes N e NSm de

isolados de TSWV contrastantes para a capacidade de infectar ‘RLT’ – A análise do gene

N dos isolados de TSWV utilizados neste estudo mostrou que estes compartilham identidade de sequência acima de 96% com isolados de TSWV disponíveis no banco de dados GenBank.

Além disso, não foram identificados polimorfismos específicos para os isolados contrastantes

(virulentos vs. avirulentos em ‘RLT’). Desta forma, análise de identidade entre as sequências

de aminoácidos para a proteína N e NSm dos isolados de TSWV indicou que a habilidade de

alguns isolados de superar a resistência de ‘RLT’ não está relacionada com variações

presentes nessas duas proteínas. Com relação à proteína N os isolados #200, #030, #501, #029

e #508 apresentaram 100% de identidade (**Figura 4**). Quando se avaliou os níveis de

identidade entre os isolados considerando a sequência de aminoácidos da proteína NSm verificou-se que os isolados #003, #508, #030, #160, #501 e #140 apresentaram 100% de identidade (**Figura 5**). Alguns isolados não foram incluídos nessa análise de identidade das proteínas N e NSm devido a problemas com sequenciamento, dessa forma estes isolados serão re-sequenciados.

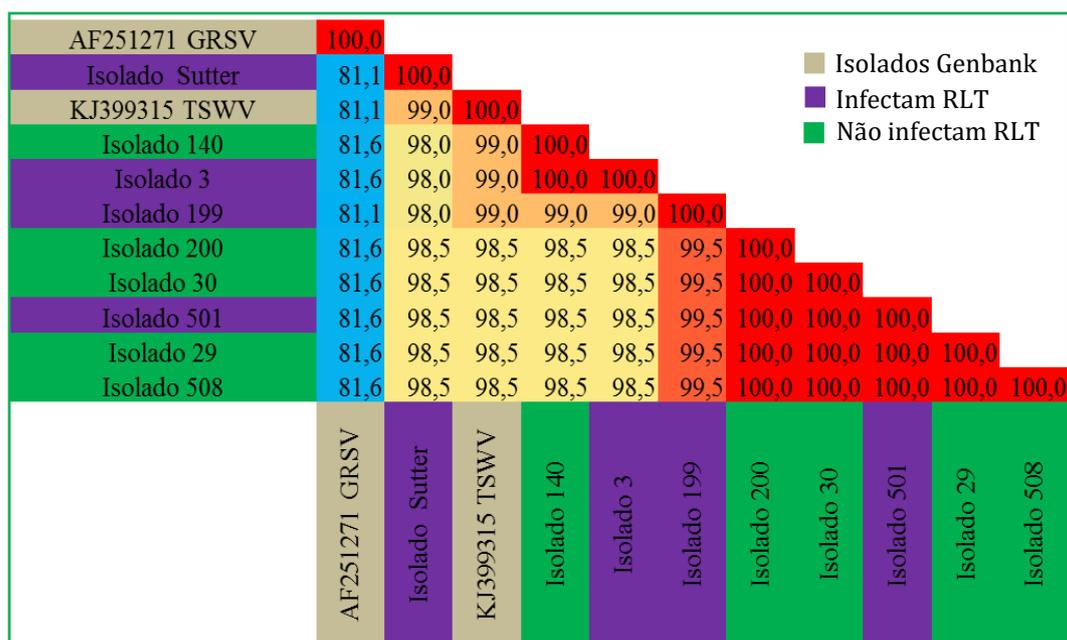


Figura 4 – Matriz representando a porcentagem de identidade da proteína N (nucleocapsídeo) entre isolados de TSWV virulentos (infectam) e avirulentos (não infectam) no acesso Rey de los Tempranos (‘RLT’) utilizados no presente estudo. A identidade da proteína N desses isolados também foi comparada com sequências da mesma proteína de isolados de referência obtidas do GenBank (**AF251271** – GRSV e **KJ399315** – TSWV).

espécie-específica, funcionando apenas contra isolados de TSWV. Todos os isolados de GRSV (com exceção do isolado ToRAJ3, que aparentemente perdeu sua virulência) e TCSV foram capazes de infectar ‘RLT’ e induzir sintomas sistêmicos semelhantes àqueles visualizados no controle suscetível. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por [Dianese et al. \(2011\)](#), que demonstraram que a resistência em ‘RLT’ foi efetiva contra um isolado de TSWV, contudo a espécie TCSV não foi avaliada.

Além de ser caracterizada como resistência do tipo espécie-específica, a resposta do acesso ‘RLT’ pode também ser caracterizada como sendo isolado-específica, uma vez que se mostrou efetiva apenas contra um subgrupo de isolados de TSWV utilizados no presente estudo. Os isolados de TSWV #003, #199 e #501 foram capazes de infectar e induzir sintomas sistêmicos em ‘RLT’, embora tardios e fenotipicamente diferentes daqueles visualizados no controle suscetível (cv. ‘Santa Clara’). [Maluf et al. \(1991\)](#) descreveram a resposta de campo do acesso ‘RLT’ a isolados de TSWV como sendo do tipo tolerância. Por sua vez, [Lourenção et al. \(1997\)](#) avaliando um grupo de cultivares de tomateiro em resposta a tospovírus em condições de campo no Estado de São Paulo, demonstrou a suscetibilidade de ‘RLT’. No entanto, o estudo de [Lourenção et al. \(1997\)](#) não caracterizou qual espécie viral predominou na área de cultivo. Essa informação é de extrema relevância, pois, como indicado no presente estudo, a resistência encontrada em ‘RLT’ não se mostrou efetiva contra isolados de GRSV e TCSV.

Estudos recentes de levantamento de tospovírus mostraram que GRSV é a espécie predominante em áreas de cultivos com tomateiro e outras hortaliças no Brasil ([Lima et al., 2015](#)). Entretanto, em outros países do Velho Mundo e no continente norte-americano a espécie de *Tospovirus* predominante ainda é o TSWV. A predominância de GRSV nos plantios de tomateiro do Brasil pode estar relacionada com a eficiência de transmissão pelo vetor, uma vez que foi demonstrado que *F. schultzei* é o mais eficiente inseto transmissor de

GRSV em condições naturais (Nagata *et al.*, 2004). No entanto, é interessante mencionar que todos os três isolados de TSWV da Califórnia avaliados no presente estudo foram capazes de quebrar a resistência do acesso ‘RLT’.

Informações preliminares sobre o controle genético da resistência a isolados de TSWV em ‘RLT’ – Com base nos resultados obtidos a partir da inoculação do isolado avirulento TSWV #523 em plantas da geração F₁ (‘RLT’ x ‘Santa Clara’), é sugerido que esta resistência isolado-específica seja conferida por fator(es) dominante(s). Entretanto, estudos de herança com populações bi-parentais segregantes envolvendo as gerações F₂ e retrocruzamentos devem ser conduzidos para determinar o controle genético dessa resistência.

Os genes R dominantes representam a segunda linha de defesa do sistema imune contra patógenos (Jones & Dangl, 2006) que envolve o silenciamento de RNA como uma das primeiras linhas de defesa contra vírus de plantas (De Ronde *et al.*, 2014). Os vírus codificam supressores de silenciamento gênico (efetores) que neutralizam a defesa basal da planta para o estabelecimento de uma infecção bem sucedida. Em uma fase seguinte, estes mesmos efetores são especificamente reconhecidos direta ou indiretamente por proteínas codificadas por genes R, resultando na imunidade desencadeada por efetores (ETI). A expressão fenotípica controlada por genes R é geralmente associada com uma indução de morte celular programada (visualizada pelo rápido aparecimento de lesões necróticas ou resposta de hipersensibilidade – HR) ou em raras ocasiões, de resistência extrema (De Ronde *et al.*, 2014). Em todos os ensaios realizados, ‘RLT’ se mostrou efetivo em conferir resistência apenas contra um subgrupo de isolados de TSWV. Na resposta de resistência a isolados de TSWV, não foram visualizadas nas plantas de ‘RLT’ inoculadas, a ocorrência de lesões locais necróticas, características de reação de hipersensibilidade (HR). Entretanto, a HR foi

verificada nas plantas da linhagem resistente ‘LAM 147’, portadora do gene *Sw-5*, porém restrita a alguns isolados.

Embora seja esperado que genes R dominantes induzam lesões locais em plantas inoculadas, isso não é comumente observado em experimentos realizados com plantas resistentes portando o gene *Sw-5*, onde a indução de HR é dependente de temperaturas altas (acima de 30 °C). A influência da temperatura sobre a expressão do gene *Sw-5* já foi relatada em tomateiro, onde as plantas podem mostrar certos níveis de instabilidade na expressão do fenótipo quando expostas a variações extremas de temperatura durante períodos do dia (Lourenção *et al.*, 1997).

Evidências de que o fator de resistência específica contra isolados de TSWV em ‘RLT’ é um alelo/gene distinto do gene *Sw-5* – Até o momento apenas o gene *Sw-5* foi reportado em tomateiro conferindo resistência ampla contra todas as espécies de *Tospovirus* que infectam o tomateiro (TSWV, GRSV, TCSV, CSNV e *Impatiens necrotic spot virus* – INSV) (Boiteux & Giordano, 1993; Spassova *et al.*, 2001; Dianese *et al.*, 2011; Hallwass *et al.*, 2014). Ao estudar as características estruturais de alelos do gene *Sw-5b*, Oliveira *et al.* (2015) verificaram que o acesso ‘RLT’ possui apenas 81% de similaridade como o gene *Sw-5*. Por meio do alinhamento das sequências do gene *Sw-5b* do acesso ‘RLT’ com a sequência do acesso original contendo o gene *Sw-5b* foi possível observar elevada incidência de deleções (Dianese *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015), indicando a não funcionalidade do gene *Sw-5* em ‘RLT’. Esta hipótese foi reforçada no presente estudo pelos resultados que demonstraram a incapacidade desse acesso em conferir resistência ampla contra espécies de *Tospovirus*, se mostrando suscetível contra todos os isolados de GRSV, TCSV e alguns isolados de TSWV. Desta forma, esses resultados sugerem que a resistência encontrada em ‘RLT’ é mediada por outro(s) gene(s) ainda não caracterizado(s) e/ou mapeado(s).

Análises de potenciais fatores de avirulência em ‘RLT’ em isolados de TSWV –

Moléculas efetoras produzidas pelos patógenos quando são reconhecidas por produtos de genes R são chamadas de fatores de avirulência. Estas moléculas são caracteristicamente variáveis e, muitas vezes, dispensáveis pelos patógenos (Dodds & Rathjen, 2010). A pressão de seleção exercida por genes R sobre determinado efector estimula o patógeno para alterações ou aquisição de novos efetores que podem suprimir a ETI, resultando na suscetibilidade do hospedeiro (Jones & Dangl, 2006). Apesar de não ter sido finalizado o estudo de herança da resistência no acesso ‘RLT’ com todas as populações segregantes para confirmar que esta se trata de uma resistência conferida por um único gene dominante, e não exista informações sobre o fator de avirulência responsável pela ativação desse(s) gene(s), com base nos resultados obtidos, é válido supor que os 14 isolados de TSWV utilizados neste ensaio apresentam uma variação no gene de avirulência. Apenas um subgrupo de isolados foi capaz de modular de alguma forma as defesas da planta e estabelecer a infecção, enquanto para outros isolados a resistência foi eficaz, pois possivelmente o gene de resistência presente em ‘RLT’ foi capaz de identificar esse patógeno e ativar as respostas de defesa.

As análises de polimorfismos dos genes codificadores das proteínas N e NSm indicaram que os isolados de TSWV contrastantes (i.e. virulentos *versus* avirulentos em ‘RLT’) compartilham altos níveis de similaridade. Além disso, não foram identificados polimorfismos específicos para os isolados contrastantes (virulentos vs. avirulentos em ‘RLT’). Estes resultados sugerem que nenhuma das duas proteínas representa ser o potencial fator de avirulência viral responsável por desencadear a resposta de resistência do acesso ‘RLT’. Dessa forma, se faz necessário um estudo mais aprofundado incluindo a análise de polimorfismos em todas as demais proteínas codificadas por TSWV, incluindo as glicoproteínas (Gn e Gc), a proteína supressora do silenciamento gênico (NSs) e a RNA polimerase (RdRp).

Recentemente dois trabalhos independentes demonstraram que a proteína NSm (responsável pelo transporte célula a célula do vírus) é o fator Avr de TSWV, sendo esse produto gênico reconhecido pelo locus *Sw-5* (Hallwass *et al.*, 2014; Peiró *et al.*, 2014). No caso do gene *Tsw*, que confere resistência específica ao TSWV foi demonstrado que o fator de avirulência é a proteína N (Lovato *et al.*, 2008). No entanto, um estudo recente conduzido por De Ronde *et al.* (2013) sugere que a proteína supressora do silenciamento gênico (NSs) é o fator de Avr do gene *Tsw*. A variabilidade da proteína NSs ainda não foi estudada com os isolados que quebram a resistência de ‘RLT’. Ensaio estão sendo conduzidos para acessar a variabilidade desse gene viral na coleção de isolados empregada no presente estudo.

Desta forma, a caracterização mais detalhada da resposta de ‘RLT’ (um acesso alternativo conferindo resistência contra TSWV) permitiu a identificação de isolados virais que superam essa resistência. De fato, a presença de isolados de tospovírus capazes de superar (‘quebrar’) a resistência é um fenômeno de certa forma esperado do ponto de vista da estrutura genômica e do sistema de replicação desse grupo de vírus. O genoma dos tospovírus é sujeito a mutações devido a sua constituição ser baseada em três segmentos distintos de RNA. Como a RdRp não possui um mecanismo de reparo (*proof-reading*) durante a replicação viral, os índices de mutação podem ser elevados (Roossinck, 1997). Desta forma, o surgimento de novos isolados recombinantes ou mutantes capazes de suplantar genes de resistência pode ser relativamente mais frequente (Herrero *et al.*, 2000).

Alguns isolados de TSWV já foram relatados superando a resistência mediada pelo gene *Sw-5* em culturas de tomate no Havaí, na Austrália, na África do Sul, na Espanha e na Itália (Ciuffo *et al.*, 2005, Latham e Jones, 1998, Thompson e Van Zijl, 1995). López *et al.* (2011) propuseram que a substituição de dois aminoácidos na proteína NSm (fator de avirulência do gene *Sw-5*) de TSWV seriam as mutações responsáveis pela superação da resistência mediada pelo gene *Sw-5b*. A superação da resistência conferida pelo gene *Sw-5*

também foi verificada em infecções mistas, em que plantas de tomateiro da cv. ‘Anastasia’ inoculada primeiramente com *Tomato chlorosis virus* (ToCV) comprometeu a resistência ao TSWV. Estes resultados sugerem que ToCV pode interferir com os mecanismos de resistência de Sw-5 (**Garcia-Cano et al., 2006**). No entanto, isolados com essas características ainda não foram detectados no Brasil, incluindo os 14 isolados de TSWV empregados no presente estudo.

As variações dos isolados de TSWV verificadas em termos de sintomas causados, virulência e capacidade de superar a resistência do hospedeiro é uma característica comum e de certa forma esperada tanto entre como dentro das espécies de *Tospovirus*. A severidade dos sintomas causados por alguns isolados de TSWV possivelmente está relacionada com uma maior capacidade desses isolados de se replicarem nos tecidos infectados, a eficiência da proteína NSs em suprimir o mecanismos de silenciamento gênico e a movimentação eficiente a curta e longa distância do vírus mediada pela proteína NSm. Estudos de genética populacional de isolados de TSWV indicaram altos níveis de variabilidade genética, estruturação geográfica de isolados e evidências de eventos generalizados de ‘*reassortment*’ (**Tsompana et al., 2005; Tentchev et al., 2011**).

CONCLUSÕES

A avaliação das plantas de 'RLT' inoculadas com 22 isolados de *Tospovirus* indicaram que a resistência encontrada neste acesso é do tipo espécie-específica e isolado-específica, funcionando apenas contra alguns isolados de TSWV, mas não efetivo contra os isolados avaliados de GRSV e TCSV. A ausência de sintomas nas plantas da geração F₁ sugere que esta resistência a um isolado de TSWV é conferida por um único gene dominante (monogênica), entretanto, resultados conclusivos só serão possíveis a partir do estudo de herança com populações segregantes incluindo plantas F₂ e plantas resultantes de retrocruzamentos (parentais \times F₁). Além do estudo de herança para identificar os fatores genéticos que controlam essa resistência, outros estudos futuros serão conduzidos visando o mapeamento genético da resistência presente em 'Rey de Los Tempranos', bem como sobre possíveis fatores de avirulência do patógeno que desencadeiam a resposta de resistência.

A ausência de sintomas na linhagem resistente 'LAM 147' mostrou que a amostra de isolados utilizada neste estudo não inclui nenhum capaz de superar a resistência mediada pelo gene *Sw-5*. Entretanto, é necessária uma avaliação constante sobre possíveis isolados capazes de superar essa resistência visando o desenvolvimento de estratégias de controle antes da disseminação em áreas de cultivo no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAMBURU J, MARTI M. **2003**. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. *Plant Pathology* 52: 407.
- BOITEUX L, GIORDANO, LB. **1993**. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71: 151–154.
- BOITEUX, LS; NAGATA T, DUTRA WP, FONSECA MEN. **1993**. Sources of resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. *Euphytica* 67: 89–94.
- BOITEUX LS, NAGATA T. **1993**. Susceptibility of *Capsicum chinense* PI 159236 to *Tomato spotted wilt virus* isolates in Brazil. *Plant Disease* 77: 210.
- BOITEUX L, DE AVILA AC. **1994**. Inheritance of a resistance specific to *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum chinense* ‘PI 159236’. *Euphytica* 75: 139–142.
- BOITEUX LS. **1995**. Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 146–149.
- BUCHER E, SIJEN T, DE HAAN P, GOLDBACH R, PRINS M. **2003**. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology* 77: 1329–1336.
- BROMMONSCHENKEL SH, FRARY A, TANKSLEY SD. **2000**. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1130–1138.
- CIUFFO M, FINETTI-SIALER M, GALLITELLI D, TURINA M. **2005**. First report in Italy of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomato cultivars carrying the *Sw-5* resistance gene. *Plant Pathology* 54: 564.
- CHENG SS, GREEN SK, GRIGGS TD, MCLEAN BT. 1989. The use of *Capsicum chinense* as sweet pepper cultivars and sources for gene transfer. In: *Tomato and Pepper Production in the Tropics*. Proceedings of the international symposium on integrated management practices, Tainan, Taiwan, 21-26 March 1988.
- COSTA AS, FORSTER R. **1941**. Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus de “spotted wilt.” *Bragantia* 1: 491–516.
- DE ÁVILA A, HAAN PD, KITAJIMA E, KORMELINK R, RESENDE RDO, GOLDBACH R, PETERS D. **1992**. Characterization of a distinct isolate of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. *Journal of Phytopathology* 134: 133–151.
- DE RONDE D, BUTTERBACH P, LOHUIS D, HEDIL M, VAN LENT JWM, KORMELINK R. **2013**. *Tsw* gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant Pathology* 14: 405–415.

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

DIANESE EC, FONSECA MEN, GOLDBACH R, KORMELINK R, INOUE-NAGATA A, RESENDE R. O, BOITEUX LS. **2010**. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Molecular Breeding* 25: 133–142.

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

DODDS PN, RATHJEN JP. **2010**. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11: 539–548.

DUARTE LML, RIVAS EB, ALEXANDRE MAV, DE ÁVILA AC, NAGATA T, CHAGAS CM. **1995**. Chrysanthemum stem necrosis caused by a possible novel tospovirus. *Journal of Phytopathology* 143: 569–571.

FINLAY K. **1953**. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Australian Journal of Biological Sciences* 6: 153–163.

GOLDBACH R; PETERS D. **1994**. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. p. 113–120, In: *Seminars in Virology*. Academic Press, New York.

GARCIA-CANO E, RESENDE RO, FERNANDEZ-MUNOZ R, MORIONES E. **2006**. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* 96: 1263–1269.

HALLWASS M, DIANESE EC, DICK LOHUIS, BOITEUX LS, NAGATA AKI, RESENDE RO, KORMELINK. **2014**. The *Tomato spotted wilt virus* cell-to-cell movement protein (NS_M) triggers a hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional *Sw-5b* resistance gene copy. *Molecular Plant Pathology* 15:871–880.

HOLMES FO. **1948**. Resistance to spotted wilt of tomato. *Phytopathology* 38: 467–473.

HERRERO S, CULBREATH AK, CSINOS AS, PAPPU HR, RUFTY RC, DAUB ME. **2000**. Nucleocapsid gene-mediated transgenic resistance provides protection against Tomato spotted wilt virus epidemics in the field. *Phytopathology* 90: 139–147.

JIANG L, HUANG Y, SUN L, WANG B, ZHU M, LI J, DONG J. **2016**. Occurrence and diversity of *Tomato spotted wilt virus* isolates breaking the *Tsw* resistance gene of *Capsicum chinense* in Yunnan, Southwest China. *Plant Pathology* (on line).

JONES J D, DANGL JL. **2006**. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.

KEARSE M, MOIR R, WILSON A, STONES-HAVAS S, CHEUNG M, STURROCK S, BUXTON S, COOPER A, MARKOWITZ S, DURAN C, THIERER T, ASHTON B, MENTJIES P, DRUMMOND A. **2012**. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop

software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.

LATHAM LJ, JONES RAC. **1998**. Selection of resistance breaking strains of *Tomato spotted wilt tospovirus* strains. *Annals of Applied Biology* 133: 385–402.

LIMA MF, BARRIOLLI CC, FONTES MG, BOITEUX LS, ALMEIDA JM. **2015**. A five-year survey of tospoviruses infecting vegetable crops in the main producing regions of Brazil. p. 117 *In: Book of Abstracts of the Xth International Symposium on Thysanoptera & Tospoviruses*, Asilomar, Pacific Grove, California, USA.

LOPEZ C, ARAMBURU J, GALIPIENSO L, SOLER S, NUEZ F, RUBIO, L. **2011**. Evolutionary analysis of tomato *Sw-5* resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology* 92: 210–215.

LOURENÇÃO AL, NAGAI H, SIQUEIRA WJ, USBERTI FILHO JA, MELO A. **1997**. Seleção de tomateiros resistentes a tospovírus. *Bragantia* 56: 21–31.

MALUF WR, BRAGHINI MT, CORTE RD. **1991**. Progress in breeding tomatoes for resistance to tomato spotted wilt. *Revista Brasileira de Genética* 14: 509–525.

MCMICHAEL LA, PERSLEY DM, THOMAS JE. **2002**. A new tospovirus serogroup IV species infecting *Capsicum* and tomato in Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathology* 313: 231–239.

NAGATA T, RESENDE RO, KITAJIMA EW, COSTA H, INOUE-NAGATA AK, ÁVILA AC. **1998**. First report of natural occurrence of *Zucchini lethal chlorosis tospovirus* on cucumber and *chrysanthemum stem necrosis tospovirus* on tomato in Brazil. *Plant Disease*. 82: 1403.

NAGATA T, ALMEIDA A, RESENDE RO, DE ÁVILA AC. **2004**. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology* 53: 136–140.

OLIVEIRA RM, DA CUNHA M, FONSECA MEN, BOITEUX LS, DIANESE EC. **2015**. Analysis of *Tospovirus* resistance factors in *Solanum* (section *Lycopersicon*) accessions. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 45: 340–347.

PAPPU HR, JONES RAC, JAIN RK. **2009**. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 2219–2236.

PEIRÓ A, CAÑIZARES MC, RUBIO L, LÓPEZ C, MORIONES E, ARAMBURU J, SÁNCHEZ-NAVARRO J. **2014**. The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. *Molecular Plant Pathology* 8: 802–813.

ROSSINCK MJ. **1997**. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35: 191–209.

SAMUEL G, BALD J, PITTMAN H. **1930**. Investigations on 'spotted wilt' of Tomatoes. *Australia, Council for Scientific and Industrial Research Bulletin*, #44.

- SCHOLTHOF, KBG, ADKINS S, CZOSNEK H, PALUKAITIS P, JACQUOT E, HOHN T, SAUNDERS K, CANDRESSE T, AHLQUIST P, HEMENWAY C, FOSTER GD. **2011**. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938–954.
- SNIPPE M, BORST JW, GOLDBACH R, KORMELINK R. **2007**. *Tomato spotted wilt virus* Gc and N proteins interact in vivo. *Virology* 357: 115–123.
- SPASSOVA MI, PRINS TW, FOLKERTSMA RT, KLEIN-LANKHORST RM, HILLE J, GOLDBACH RW, PRINS M. **2001**. The tomato gene *Sw-5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding* 7: 151–161.
- STEVENS M, SCOTT S, GERGERICH R. **1991**. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59: 9–17.
- TENTCHEV D, VERDIN E, MARCHAL C, JACQUET M, AGUILAR JM, MOURY B. **2011**. Evolution and structure of *Tomato spotted wilt virus* populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology* 92: 961–973.
- THOMPSON G, VAN ZIJL J. **1995**. Control of *Tomato spotted wilt virus* in tomatoes in South Africa. *Acta Horticulturae* 431: 379–384.
- TSOMPANA M, ABAD J, PURUGGANAN M, MOYER JW. **2005**. The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Molecular Ecology* 14: 53–66.
- TAKEDA A, SUGIYAMA K, NAGANO H, MORI M, KAIDO M, MISE K, TSUDA S, OKUNO T. **2002**. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Letters* 532: 75–79.
- TURINA M, KORMELINK R, RESENDE RO. **2016**. Resistance to tospoviruses in vegetable crops: Epidemiological and molecular aspects. *Annual Review of Phytopathology* 54: 15.1–15.25.
- ULLMAN DE, WHITFIELD AE, GERMAN TL. **2005**. Thrips and tospoviruses come of age: Mapping determinants of insect transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 4931–4932.
- VAN POELWUK F, BOYE K, OOSTERLING R, PETERS D, GOLDBACH R. **1993**. Detection of the L protein of *Tomato spotted wilt virus*. *Virology* 197: 468–470.
- WHITFIELD A E, ULLMAN DE, GERMAN TL. **2005**. Tospovirus-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43: 459–489.
- WIJKAMP I, ALMARZA N, GOLDBACH R, PETERS D. **1995**. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* 85: 1069–1074.

CAPÍTULO IV

Identificação de soja, ervilha, almeirão, jiló e jurubeba vermelha como novas hospedeiras naturais de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) no Brasil.

RESUMO

Amostras foliares com sintomas similares aos induzidos por espécies de *Tospovirus* (clorose, necrose foliar intensa, mosqueado, anéis concêntricos e deformação foliar) foram coletadas em campos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], ervilha (*Pisum sativum* L.), jiló (*Solanum aethiopicum* L. var. *gilo* Raddi), almeirão (*Cichorium intybus* L.) e jurubeba vermelha (*S. stramonifolium* Jacq.) em Brasília-DF, Brasil. As amostras foram identificadas e um isolado foi obtido de cada planta suspeita de estar infectada por tospovírus (ER1 – ervilha; AL1 – Almeirão; JB – jurubeba vermelha; S1 – soja; J1 – jiló). Para a identificação do agente causal da doença foram realizados testes sorológicos, moleculares e círculo de plantas hospedeiras. O RNA total das amostras foliares sintomáticas extraído utilizando-se TRIzol® (Ambion) foi utilizado como molde para a transcrição reversa e amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para a transcrição reversa foi utilizada a enzima M-MLV *reverse* e o *primer* J13 (5'-CCC-GGA-TCC-AGA-GCA-AT-3') para a amplificação completa de segmentos do RNA S e RNA M. Para a reação da PCR foram utilizados *primers* específicos para TSWV e GRSV. Análise via PCR dos isolados obtidos de soja, ervilha, jiló, almeirão e jurubeba vermelha foi conduzida utilizando *primers* específicos para a proteína N. Amostras foliares sintomáticas foram paralelamente avaliadas por meio de sorologia (ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando antissoros específicos contra a proteína N de GRSV, TSWV e TCSV. Os isolados obtidos foram mecanicamente inoculados em círculo de hospedeiras distribuídas

dentro de três famílias botânicas (Solanaceae, Fabaceae e Amaranthaceae). Os resultados revelaram amplicons de ≈ 600 pb apenas com *primers* específicos para a espécie GRSV. O alinhamento das sequências dos cinco isolados mostrou identidade de nucleotídeos, acima de 94%, com ampla gama de isolados de GRSV depositadas no GenBank. Resultados dos testes sorológicos (ELISA) confirmaram que as plantas sintomáticas foram positivas apenas para a espécie GRSV. Todos os isolados foram capazes de induzir sintomas característicos de tospovirose em ensaios de círculos de hospedeiras. Desta forma, o presente trabalho relata, pela primeira vez, cinco novas espécies como hospedeiras naturais de GRSV nas condições brasileiras. A identificação dessas hospedeiras pode apresentar consequências epidemiológicas e impactar a adoção de estratégias de manejo, incluindo o controle da multiplicação de tripses virulíferos nestas plantas bem como na escolha mais criteriosa de sistemas de rotação de culturas.

Palavras chaves: tospovírus, Solanaceae, Fabaceae e Amaranthaceae.

ABSTRACT

Foliar samples with symptoms similar to those induced by *Tospovirus* species (chlorosis, necrosis, leaf mottling, concentric rings and leaf deformation) were collected in fields of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], field peas (*Pisum sativum* L.), scarlet eggplant (*Solanum aethiopicum* L. var. *gilo* Raddi), chicory (*Cichorium intybus* L.), and red jurubeba (*S. stramonifolium* Jacq.) in Brasília–DF, Brazil. The samples were identified and one isolate was obtained from each plant suspected of being infected by tospovirus (ER1-pea; A11 – chicory; JB – red jurubeba; S1-soybean; JL- scarlet eggplant). For the identification of the causal agent of the disease serological and molecular tests were carried out as well as bioassays with inoculation of a standard set of tospovirus host species. The total RNA of symptomatic foliar

samples was extracted using TRIzol® (Ambion). Total RNA was used as a template for reverse transcription and amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR). For reverse transcription, the enzyme M-MLV reverse and the primer J13 (5'-CCC-GGA-TCC-AGA-GCA-AT-3') were used for the complete amplification of the genomic segments S and M. Specific primers for the N protein of TSWV and GRSV were employed in PCR assays with the cDNA obtained from all five plant species. Symptomatic leaf samples were evaluated in parallel via Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using specific antisera against GRSV, TSWV, and TCSV. The isolates were mechanically inoculated in a set of test plants belonging to three botanical families (Solanaceae, Fabaceae and Amaranthaceae). The results revealed amplicons of \approx 600 bp only with primers specific to GRSV for all five isolates. The sequence analyses and alignment of amplicons of isolates indicated identity levels above 94% with sequences of a wide range of GRSV isolates available at GenBank. Results of the serological tests confirmed that symptomatic plants were positive only for the GRSV. All isolates were able to induce symptoms characteristic of tospoviroses in all the evaluated experimental hosts. It is the first report of these plant species as natural hosts of GRSV under Brazilian conditions. The identification of these new host species might have epidemiological consequences and to impact the implementation of management strategies, including the control of viruliferous thrips multiplication in these plants as well as the adoption of the most suitable crop rotation systems.

Keywords: tospovirus, Solanaceae, Fabaceae e Amaranthaceae.

INTRODUÇÃO

O gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae*, possui genoma tripartido denominado, de acordo com o seu tamanho, de *large* (L ~8.9 kb), *medium* (M ~4.8 kb) e *small* (S ~2.9 kb). O RNA L é de polaridade negativa e codifica a proteína estrutural RdRp. O RNA M é ambisenso e codifica a proteína não estrutural NSm (proteína de movimento responsável pelo transporte célula-a-célula) na orientação senso positivo e os precursores das glicoproteínas Gn e Gc no sentido negativo. O RNA S de menor tamanho é ambisenso e sintetiza a proteína NSs (supressora do silenciamento gênico) na orientação senso positivo e a proteína N na orientação senso negativo, a qual forma o nucleocapsídeo viral e está envolvida na regulação da transcrição/replicação (Takeda *et al.*, 2002, Bucher *et al.*, 2003, Snippe *et al.*, 2007). Espécies de *Tospovirus* são transmitidas por tripes de maneira circulativa-propagativa (Wijkamp *et al.*, 1995).

A classificação do gênero *Tospovirus* (recentemente reclassificado para o gênero *Orthotospovirus*, família *Tospoviridae*, ordem *Bunyavirales* – ICTV, 2017), baseia-se na morfologia do *virion*, na organização do genoma e nas características de transmissão por tripes. As características biológicas (como círculo de hospedeiros e espécies do inseto vetor) e características moleculares (sequência de aminoácidos da proteína N) têm sido utilizadas como os principais critérios taxonômicos para definir espécies dentro do gênero *Tospovirus* (de Ávila, 1993; Resende, 1996; Roselló *et al.*, 1996; Plyusnin *et al.*, 2012). Duas espécies são consideradas distintas quando apresentam nível de identidade inferior a 90% na sequência de aminoácidos da proteína N (Plyusnin *et al.*, 2012).

A doença denominada “spotted wilt” ou “vira-cabeça”, causada por tospovírus, é uma das mais importantes para a agricultura em todo o mundo. Espécies do gênero *Tospovirus* são encontradas em todos os continentes infectando uma ampla gama de hospedeiros em diversas famílias botânicas (Pappu *et al.*, 2009; de Oliveira *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2011; Adkins *et*

al., 2005). As solanáceas e as asteráceas contêm o maior número de espécies suscetíveis a tospovírus, afetando principalmente o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), o pimentão (*Capsicum annuum* L.), o fumo (*Nicotiana tabacum* L.), a alface (*Lactuca sativa* L.), o crisântemo (*Chrysanthemum* spp.) e o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (Adkins *et al.*, 2005).

As espécies de *Tospovirus* relatadas infectando hortaliças e no Brasil incluem *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), *Iris yellow spot virus* (IYSV) e a espécie tentativa *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV) (Costa & Forster, 1941; Duarte *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 1998; Pozzer *et al.*, 1999; de Oliveira *et al.*, 2012). Existem diversos relatos de TSWV infectando solanáceas (Kitajima, 1986) e leguminosas (família Fabaceae) tais como ervilha – *Pisum sativum* L. (Reifschneider *et al.*, 1989), como lentilha – *Lens culinaris* Medik (Fonseca *et al.*, 1995) e grão-de-bico – *Cicer arietinum* L. (Boiteux *et al.*, 1995). No entanto, mais recentemente, diferentes levantamentos indicaram que o GRSV está predominando em relação ao TSWV em áreas de cultivos com tomateiro, outras hortaliças e também em plantas nativas e invasoras (Lima *et al.*, 2015). No Brasil, além do tomateiro, o GRSV tem sido formalmente reportado infectando o pimentão, pimentas, alface, cubio (*Solanum sessiliflorum*), pepino (*Cucumis sativus*), melancia (*Citrullus lanatus*), coentro (*Coriandrum sativum* L.) e amendoim (de Ávila *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 1999; Pappu *et al.* 2009; Boari *et al.*, 2002; Spadotti *et al.*, 2014; García *et al.* 2014; Leão *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2015).

Uma determinação mais precisa do círculo de hospedeiras naturais de tospovírus pode contribuir no estabelecimento de estratégias de controle mais eficientes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo relatar e caracterizar isolados de GRSV identificados em novas plantas hospedeiras através de métodos biológicos, sorológicos e moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras foliares sintomáticas – Plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], ervilha (*Pisum sativum* L.), jiló (*Solanum aethiopicum* L. var. *gilo* Raddi), jurubeba vermelha (*S. stramonifolium* Jacq.) e almeirão (*Cichorium intybus* L.) exibindo sintomas semelhantes ao induzidos por espécies de *Tospovirus* (clorose, necrose foliar intensa, mosqueado e deformação foliar) foram coletadas no Campo Experimental da Embrapa Hortaliças (Brasília–DF) no período de setembro/2016 a janeiro/2017 (**Figura 1**).

Avaliação em círculo de hospedeiras – As amostras coletadas no campo foram identificadas de acordo com a planta hospedeira e cada amostra coletada correspondeu a um isolado (ER1 – ervilha; AL1 – Almeirão; JB – Jurubeba; S1 – soja; J1 – Jiló). O teste de gama de hospedeiros foi realizado utilizando diferentes espécies distribuídas dentro da família Solanaceae (*Datura stramonium*, *Nicandra physaloides*, *N. rustica*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* ‘TNN’, *C. chinense* ‘PI 159236’, tomateiro cv. ‘Santa Clara’ e pimentão cv. ‘Ikeda’), Fabaceae (*P. sativum*) e Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*). As plantas foram mecanicamente inoculadas com os cinco isolados obtidos a partir de diferentes hospedeiras. As amostras foliares provenientes do campo foram maceradas em tampão de inoculação contendo fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) 0,02 M e sulfito de sódio (Na_2SO_3) 1% (P-V) em água destilada, pH 7,0. Em seguida, as plantas foram polvilhadas com *carborundum* (400 mesh) e mecanicamente inoculadas com o extrato infeccioso. Após a inoculação, as folhas foram lavadas para retirar o excesso de *carborundum* e evitar a queima das folhas. As plantas foram avaliadas semanalmente quanto à presença de sintomas e aproximadamente aos 25 dias foram coletadas amostras foliares das plantas sintomáticas para realização de teste sorológico (ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Plantas de *P. sativum* (cv. ‘Kodama’) foram inoculadas apenas com o isolado obtido da ervilha (ER1).



Figura 1 – Sintomas induzidos por tospovírus em ervilha (**A & B**), Almeirão (**C**) e Jurubeba (**D**). Na ervilha são observados sintomas de necrose intensa nas folhas apicais, anéis nas vagens e necrose nos ramos. Os sintomas no almeirão incluem necrose intensa, clorose, manchas cloróticas e necróticas concêntricas e rugosidade. Na jurubeba os sintomas induzidos por GRSV caracterizam-se por uma clorose intensa das folhas apicais, necrose e rugosidade.



Figura 2. Sintomas de clorose, mosqueado e mosaico induzidos em plantas de soja naturalmente infectadas em condições de campo.

Sorologia (dot blot) – Amostras foliares obtidas das cinco espécies (soja, jiló, ervilha, almeirão e jurubeba vermelha) identificadas no campo com sintomas semelhantes aos induzidos por tospovírus foram diretamente testadas por sorologia (ELISA) utilizando antissoro específico contra a capa proteica de GRSV, TSWV e TCSV. Após a inoculação dos isolados em espécies do círculo de hospedeiras, as plantas que reproduziram sintomas de tospovirose foram novamente testadas por sorologia (ELISA) para confirmação da presença do agente causal. A análise de sorologia foi realizada por dot-blot (Almeida, 1995). Este teste é realizado em membranas de nitrocelulose. Primeiramente a membrana de nitrocelulose foi imersa em solução 0,5X PBS-Tween (0,02M KH₂PO₄; 0,02M KCL; 1,4M NaCl; 0,08M Na₂HPO₄, pH 7,4) até ficar completamente umedecida e após este procedimento foi colocada sobre papel filtro para secar. Pequenos discos foliares das amostras de cada planta foram colocados separadamente em sacos plásticos e macerados em tampão 0,5X PBS-T. Em seguida 5 µL do extrato das amostras bem como dos controles positivo e negativo foram aplicados na membrana. Após aplicação das amostras estas foram mergulhadas em solução bloqueadora [0,5X PBS-T, pH 7,4, acrescido de 2% de leite em pó (Molico) desnatado –

LPD] e colocadas em agitador durante uma hora em temperatura ambiente. A seguir adicionou-se o antissoro (IgG específico) na diluição de 1:1000 permanecendo em agitação *overnight*. Passado o período de incubação, procedeu-se à lavagem das membranas em tampão 0,5X PBS-T. Este procedimento foi realizado três vezes. Posteriormente foi adicionado o conjugado geral (goat-anti-rabbit-SIGMA/A3887) diluído na proporção de 1:30000 em 0,5X PBS, o qual permaneceu agitando por cerca de 3 horas. Novamente foram realizadas três lavagens com 0,5X PBS-T. O complexo antígeno/anticorpo foi detectado pela adição do tampão de revelação (1M Tris-base; 0,1M NaCl; 5 mM MgCl₂, pH 9,5) juntamente com 5-bromo-4-clor-3-indolil fosfato (BCIP) e “nitroblue tetrazolium” (NBT), proporção 1:2 de BCIP-NBT. Nesta solução, a membrana foi colocada no agitador até o surgimento dos resultados, quando a membrana foi retirada da solução e mergulhada em água.

RT-PCR (*Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*) – O RNA total das amostras foliares de soja, ervilha, jiló, almeirão e jurubeba foram extraídos utilizando-se TRIzol® (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração do RNA total, procedeu-se à síntese do cDNA, utilizando-se o RNA total como molde para a transcrição reversa e, em seguida, amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para a transcrição reversa foi utilizada a enzima M-MLV *reverse transcriptase* (Promega) e o *primer* J13 (5'-CCC-GGA-TCC-AGA-GCA-AT-3') que possui oito nucleotídeos conservados presentes nas terminações dos três RNAs genômicos virais, permitindo a amplificação completa do segmento RNA S e RNA M (Cortez *et al.*, 2001). Para a reação de PCR foram utilizados *primers* específicos para o a proteína N e NSm de TSWV e GRSV. Os produtos da PCR foram analisados em géis de agarose (1%) corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Todos os quatro isolados foram diretamente sequenciados através dos produtos da PCR utilizando-se os *primers* específicos para cada espécie de tospovírus

detectada, de acordo com o resultado da PCR. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI PRISM 3100 do Laboratório de Análise Genômica da Embrapa Hortaliças (CNPQ), utilizando o Kit ABI Prism BigDye® version 3.1 (Applied Biosystems do Brasil). A análise da qualidade das sequências, remoção dos segmentos de baixa qualidade (Allex, 1999) e a obtenção das sequências consenso foram realizadas usando o programa SeqMan® (Lasergene, Madison, Wisconsin-WI). As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco público de dados do GenBank, empregando algoritmo Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RESULTADOS

As amostras foliares de soja, ervilha, jiló, almeirão e jurubeba vermelha, coletadas na região de Brasília-DF, reagiram de maneira positiva apenas contra o antissoro para GRSV, entretanto ocorreu reação cruzada entre TCSV. A detecção molecular realizada por PCR utilizando *primers* específicos para a proteína N mostrou a amplificação de um fragmento de ≈ 600 pb apenas para a espécie GRSV. Os resultados obtidos a partir de sorologia e PCR indicaram que as plantas de soja, ervilha, jiló, almeirão e jurubeba (exibindo sintomas de tospovírus) estavam exclusivamente infectadas com a espécie viral GRSV. A partir desses resultados foi realizada uma segunda PCR utilizando *primers* que amplificam a proteína NSm. Por enquanto foram sequenciados apenas os isolados coletados da ervilha, almeirão e jurubeba, o sequenciamento dos isolados da soja e do jiló está em andamento.

As sequências de nucleotídeos dos isolados de tospovírus foram submetidas à busca no Blastn (Altschul *et al.*, 1990) para comparação com as sequências de tospovírus disponíveis no banco de dados do GenBank e identificação da respectiva espécie. A comparação das sequências de nucleotídeos do isolado ER1 com outros isolados de GRSV depositados no

GenBank revelou que eles compartilham de 96% (AF251271.1) a 99% (HQ644140.1) de identidade de nucleotídeos do gene N (nucleocapsídeo). A comparação entre sequências de nucleotídeos correspondendo ao gene NSm mostrou identidade de sequência de 91% (KM007017.1) a 95% (KT972591.1) do isolado ER1 com sequências de isolados de GRSV depositadas no GenBank. Foi observado também que a proteína NSm do isolado ER1 (GRSV) apresentou identidade de sequência variando de 90% (KF819828.1) a 94% (JX244200.1) com isolados da espécie TCSV, sugerindo a estreita relação entre isolados de GRSV e TCSV. Entretanto, tanto a análise das sequências de nucleotídeos do gene N quanto do gene NSm do isolado ER1 mostraram baixa identidade de sequências com isolados de TSWV depositados no GenBank.

Análises comparativas entre sequências de nucleotídeos do isolado AL1 (correspondendo ao gene N) e de isolados de GRSV indicaram que a identidade variou de 96% (KT345728.1) a 98% (AF513219.1). A identidade da sequência de nucleotídeos do gene N de AL1 com isolados de TCSV e TSWV foi inferior a 85%. Com relação à proteína NSm, foi verificado que o isolado AL1 compartilha de 90% (KC969459.1) a 94% (KR012985.1) de identidade de sequências com isolados de TCSV depositados no GenBank, um resultado de certa forma esperado.

Embora o sequenciamento de produtos da PCR obtidos pela amplificação do gene NSm do isolado JB obtido de jurubeba não tenha resultado em sequências de boa qualidade, as sequências referentes ao gene N apresentaram boa qualidade e foi possível realizar a análise utilizando a ferramenta BLAST. A análise comparativa com outras sequências depositadas no GenBank mostrou que o isolado JB possui identidade variando de 95% (U49700.1) a 99% (HQ644140.1) com outros isolados de GRSV, já relatados.

Todos os isolados inoculados na gama de hospedeiras foram capazes de induzir sintomas característicos de tospovirose como manchas cloróticas e/ou necróticas em formato

de anéis concêntricos nas folhas, deformação foliar, clorose, mosqueado e necrose foliar intensa. Os sintomas típicos da infecção por tospovírus foram primeiramente visualizados nas plantas de *D. stramonium*, *N. rustica* e *N. benthamiana*. Entretanto, aos 20 dias após a inoculação todas as plantas já exibiam sintomas de tospovirose (**Figura 2**). A presença de infecção por GRSV em espécies indicadoras inoculadas foi confirmada por meio de teste sorológico. O ‘PI 159236’ quando inoculado com isolados de TSWV produz o fenótipo de reação de hipersensibilidade (HR) devido à presença do gene *Tsw*, o qual confere resistência específica ao TSWV, as espécies GRSV e TCSV induzem sintomas sistêmicos e necróticos no ‘PI 159236’ (**Boiteux & De Ávila, 1994**). Dessa forma, esse acesso de *C. chinense* é amplamente utilizado como planta diferenciadora e que auxilia na identificação de espécies de *Tospovirus*. As plantas de ervilha inoculadas mecanicamente não exibiram sintomas, possivelmente a transmissão pelo vetor é mais eficiente nestas plantas, ou mesmo a variedade de ervilha utilizada no teste não seja suscetível a tospovírus, considerando-se que ervilha não é hospedeiro preferencial desses vírus.



Figura 2 – Sintomas induzidos por *Groundnut ringspot vírus* (GRSV) em espécies indicadoras. Sintomas induzidos em *Gomphrena globosa* pelo isolado ER1 (A). Sintomas iniciais em *N. rustica* induzidos pelo isolado AL1 (B). Sintomas de anéis concêntricos, típicos de tospovirus, em *N. tabacum* cv. TNN (C). Planta de tomateiro (cv. ‘Santa Clara’) apresentando sintoma severo de necrose foliar, clorose e curvatura do ápice foliar (D).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicaram que soja, jiló, jurubeba, almeirão e ervilha são hospedeiras naturais da espécie de GRSV. De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro relato dessas espécies como hospedeiras de GRSV no país.

A identificação e caracterização do agente causador dos sintomas visualizados nessas plantas em condições de campo somente foi possível a partir de testes de diagnose, incluindo testes sorológicos (ELISA), moleculares e inoculação em círculo de hospedeiras. A partir do estudo de círculo de hospedeiros foi possível concluir que esses isolados de GRSV possuem habilidade para infectar um grupo diverso de plantas. Os isolados de GRSV inoculados foram capazes de induzir sintomas em espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas (Solanaceae, Fabaceae e Amaranthaceae), sugerindo que em condições de campo podem ser disseminados para uma gama ainda maior de espécies vegetais, principalmente em condições de alta pressão de populações de tripes.

A detecção e caracterização de soja, almeirão, jiló, jurubeba e ervilha como novos hospedeiros da espécie GRSV pode levar o produtor a repensar as estratégias da sucessão/rotação de cultivos. Por exemplo, no caso da soja, que principalmente na região Centro-Oeste está sempre em sucessão ao tomateiro, a permanência de tripes virulíferos em áreas de plantio ou a presença de outras plantas hospedeiras alternativas, representa grande ameaça para que esse patógeno possa se expandir para a soja, uma vez que foi observada alta incidência de plantas sintomáticas em condições de campo, embora a soja não seja hospedeira preferencial de GRSV.

Estudos de levantamento de tospovírus mostraram que GRSV tem sido identificado como sendo a espécie predominante em áreas de cultivos com tomateiro e outras hortaliças nos últimos anos (Lima *et al.*, 2015). A predominância de GRSV pode estar relacionada com a maior eficiência de transmissão pelo inseto vetor, uma vez que *F. schultzei* foi identificado como o principal inseto transmissor de GRSV em condições naturais, explicando a prevalência desta espécie viral nos plantios de tomateiro do Brasil (Nagata *et al.*, 2004).

A espécie GRSV foi identificada primeiramente em plantas de tomateiro na América do Sul (de Ávila *et al.*, 1993; Dewey *et al.*, 1995), e posteriormente foi reportada infectando

soja na África do Sul (**Pietersen & Morris, 2002**), amendoim na Argentina (**De Breuil et al., 2007**), pimentão na América do Sul (**Pappu et al. 2009**).

No Brasil, as culturas mais afetadas pelo GRSV são as solanáceas tais como o tomate, o pimentão, as pimentas (*C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum*) e *S. sessiliflorum* (**Boari et al., 2002**). Desta forma, o jiló e a jurubeba ampliam a lista de hospedeiras dentro dessa família botânica. As asteráceas são também afetadas pelo GRSV, sendo um problema especialmente importante para a alface (**Lima et al., 2015**). Desta forma, o relato do almeirão como hospedeiro deste vírus amplia a lista de hospedeiros dentro da família.

Considerando que este é o primeiro relato de GRSV infectando naturalmente as fabáceas soja e ervilha em condições de campo, ressalta-se a importância de realização de monitoramento regular da presença desse vírus em outras lavouras dessa família botânica, bem como a população do inseto vetor em áreas de cultivo. **Reifschneider et al. (1989)** já haviam relatado a ocorrência de TSWV induzindo sintomas em folhas, vagens, ramos e sementes de ervilha, entretanto não detectaram a transmissão de TWSV por sementes. Além da ervilha, outras espécies leguminosas como lentilha (*Lens culinaris* Medik.) e grão de bico (*Cicer arietinum* L.) já foram reportadas como hospedeiras de TSWV no Brasil Central (**Fonseca et al., 1995; Boiteux et al., 1995**). Posteriormente, **García et al. (2014)** detectaram alta incidência de plantas de amendoim infectada com GRSV no Estado de São Paulo.

Outras hospedeiras já reportadas do GRSV no Brasil incluem o pepino (**Spadotti et al., 2014**) e coentro (**Lima et al., 1999**). Em 2015, foi reportada a ocorrência de GRSV infectando melancia no Estado de São Paulo (**Leão et al., 2015**) e em Goiás (**Lima et al., 2015**). Isolados de GRSV foram também têm sido reportados na América do Norte. **Webster et al. (2011)** detectaram e caracterizaram isolados coletados em plantios de tomate na Flórida, EUA. Entretanto, estes isolados norte-americanos (denominados L_GM_TS_G) eram recombinantes e apresentavam os segmentos S e L de GRSV e M de TCSV. Estudos

subsequentes mostraram que L_{GM_TSG} está distribuído em regiões produtoras do Sul da Flórida, Carolina do Sul e Nova Iorque ([Webster et al., 2015](#)).

As espécies GRSV e TCSV compartilham características biológicas e sorológicas que dificultam a sua detecção, portanto, a identificação dessas espécies é realizada, principalmente por métodos moleculares. [De Breuil et al. \(2016\)](#) sequenciaram todos os RNAs genômicos de GRSV através da técnica de *deep sequencing*. Ao analisarem os dados mostraram que GRSV e TCSV compartilham alta similaridade de sequências (mais de 90% de identidade), observada nos genes e proteínas codificadas pelo RNA M, suportando a hipótese de que essas espécies, provavelmente possuem um ancestral comum. Neste estudo, a alta similaridade entre essas duas espécies foi verificada através da comparação entre as sequências de nucleotídeos do gene NSm. Esses resultados explicam porque essa proteína não é utilizada como critério de demarcação de espécie. Apesar de o critério ser ainda baseado na sequência de aminoácidos da proteína N, vários estudos levantam a hipótese de utilização de outros critérios ([Oliver et al., 2016](#); [de Breuil et al., 2016](#)), como o genoma completo, por exemplo, principalmente após a identificação de isolados recombinantes ocorrendo em condições naturais. Assim o uso de um único segmento para demarcar espécies pode mascarar a ocorrência desses recombinantes. [Bertran et al. \(2011\)](#) propôs a utilização da proteína L, devido a sua alta conservação, como fator adicional aos critérios de classificação das espécies do gênero.

As tospovirose se caracterizam por serem economicamente importantes devido à severidade dos sintomas que causam em hospedeiros suscetíveis que, na maioria dos casos afetam diretamente o produto final. Neste contexto, a identificação dessas novas espécies hospedeiras pode ter consequências epidemiológicas e impactar a adoção de estratégias de manejo especialmente em relação ao controle da multiplicação de tripses virulíferos nestas espécies de plantas bem como na escolha mais adequada de sistemas de rotação de culturas.

CONCLUSÕES

Foi demonstrado no presente estudo que a soja, jiló, jurubeba vermelha, almeirão e ervilha representam novas hospedeiras de GRSV no Brasil. Do ponto de vista do cultivo do tomateiro para processamento no Brasil Central a identificação da soja e da ervilha como hospedeiras apresentam maior relevância. Estes dois cultivos fazem parte da paisagem rural na região e são comumente empregadas em sistemas de rotação com o tomateiro em áreas de pivô-central. Neste contexto, o estudo sobre a ocorrência e distribuição de GRSV em áreas produtoras de soja pode contribuir para o desenvolvimento prévio de estratégias de controle que evitem a entrada do patógeno nos campos de tomateiro através do controle do químico do vetor ou através do desenvolvimento de cultivares resistentes para todas as culturas empregadas em sistemas de rotação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS S, ZITTER T, MOMOL T. **2005**. Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus *Tospovirus*). Universidad of Florida IFAS (Institute of Food & Agricultural Science) pp. 212.
- ALLEX CF. **1999**. Computational methods for fast and accurate DNA fragment assembly. Ph.D. Thesis. University of Wisconsin. Wisconsin, Madison.
- ALMEIDA AMR. **1995**. Noções de sorologia aplicadas a fitovirologia. Londrina: Embrapa-CNPSO. 105 p.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. **1990**. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- BERTRAN AG, OLIVEIRA AS, NAGATA T, RESENDE RO. **2011**. Molecular characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from *Groundnut ringspot virus* (genus *Tospovirus*, family Bunyaviridae). *Archives of Virology* 156: 1425–1429
- BOARI AJ, MACIEL-ZAMBOLIM E, LAU DD, LIMA GSA, KITAJIMA EW, BROMMONSCHENKEL SH, ZERBINI FM. **2002**. Detection and partial characterization of an isolate of *Groundnut ringspot virus* in *Solanum sessiliflorum*. *Fitopatologia Brasileira* 27: 249–253.
- BOITEUX L, DE AVILA AC. **1994**. Inheritance of a resistance specific to *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum chinense* ‘PI 159236’. *Euphytica* 75: 139–142.
- BOITEUX LS, AVILA AC, GIORDANO LB, LIMA MI, KITAJIMA EW. **1995**. Apical chlorosis disease of chickpea (*Cicer arietinum*) caused by *Tomato spotted wilt virus* in Brazil. *Journal of Phytopathology* 143: 629–631.
- BUCHER E, SIJEN T, DE HAAN P, GOLDBACH R, PRINS M. **2003**. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology* 77: 1329–1336.
- CORTEZ I, SAAIJER J, WONGJKAEW KS, PEREIRA AM, GOLDBACH R, PETERS D, KORMELINK R. **2001**. Identification and characterization of a novel tospovirus species using a new RT-PCR approach. *Archives of Virology* 146: 265–278.
- COSTA AS, FORSTER R. **1941**. Identidade do vírus de vira-cabeça e sua inclusão no grupo do vírus de “spotted wilt”. *Bragantia* 1: 491–516.
- DE BREUIL S, CAÑIZARES J, BLANCA JM, BEJERMAN N, TRUCCO V, GIOLITTI F, LENARDON S. **2016**. Analysis of the coding-complete genomic sequence of *Groundnut ringspot virus* suggests a common ancestor with tomato chlorotic spot virus. *Archives of Virology* 161: 2311–2316

- DE BREUIL S, ABAD J, NOME C, GIOLITTI F, LAMBERTINI P, LENARDON, S. **2007**. *Groundnut ringspot virus*: an emerging *Tospovirus* inducing disease in peanut crops. *Journal of Phytopathology* 155: 251–254.
- DE ÁVILA A, HAAN PD, KITAJIMA E, KORMELINK R, RESENDE RDO, GOLDBACH R, PETERS D. **1992**. Characterization of a distinct isolate of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. *Journal of Phytopathology* 134: 133–151.
- DE ÁVILA AC. **1993**. Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): Organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle. *Horticultura Brasileira* 11: 179–183.
- DEWEY RA, SEMORILE L, GRAU O, DE AVILA AC, KITAJIMA EW. **1995**. Characterization of the N gene of a *Groundnut ringspot virus* (GRSV) isolate from Argentina. *Journal of Phytopathology* 143: 713–717.
- DUARTE LML, RIVAS EB, ALEXANDRE MAV, DE ÁVILA AC, NAGATA T, CHAGAS CM. **1995**. *Chrysanthemum stem necrosis* caused by a possible novel tospovirus. *Journal of Phytopathology* 143: 569–571.
- DE OLIVEIRA AS, MELO FL, INOUE-NAGATA AK, NAGATA T, KITAJIMA EW, RESENDE RO. **2012**. Characterization of Bean necrotic mosaic virus: A member of a novel evolutionary lineage within the genus *Tospovirus*. *PLoS One* 7: e38634.
- FONSECA MEN, BOITEUX LS, AVILA AC, LIMA MI, KITAJIMA EW. **1995**. Detection of tomato spotted wilt tospovirus in lentil. *Plant Disease* 79: 320.
- GARCÍA VMC, LIMA EFB, CÓRDOVA PJM, REZENDE JAM, KITAJIMA EW, BARRETO M. **2014**. Occurrence of *Groundnut ringspot virus* on Brazilian peanut crops. *Journal of General Plant Pathology* 80: 282–286.
- KITAJIMA EW. **1986**. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1911–1985). *Fitopatologia Brasileira* (suplemento especial). 94 pp.
- LEÃO EU, SPADOTTI DMDA, ROCHA KCG, PANTOJA KDFDC, REZENDE JAM, PAVAN MA, KRAUSE-SAKATE R. **2015**. *Citrullus lanatus* is a new natural host of *Groundnut ringspot virus* in Brazil. *Journal of Phytopathology* 163: 1014–1018.
- LIMA MF, DE ÁVILA AC, WANDERLEY-JUNIOR JLG, NAGATA T. **1999**. Coriander: A new natural host of *Groundnut ring spot virus* in Brazil. *Plant Disease* 83: 878.
- LIMA MF, BARRIOLLI CC, FONTES MG, BOITEUX LS, ALMEIDA JM. **2015**. A five-year survey of tospoviruses infecting vegetable crops in main producing regions of Brazil. p. 117 *In: Book of Abstracts of the Xth International Symposium on Thysanoptera & Tospoviruses, Asilomar, Pacific Grove, CA: USDA-ARS.*
- NAGATA T, RESENDE RO, KITAJIMA EW, COSTA H, INOUE-NAGATA AK, ÁVILA AC. **1998**. First report of natural occurrence of *Zucchini lethal chlorosis* tospovirus on cucumber and *Chrysanthemum stem necrosis* tospovirus on tomato in Brazil. *Plant Disease* 82: 1403.

NAGATA T, ALMEIDA A, RESENDE RO, DE ÁVILA. **2004**. The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology* 53: 136–140.

OLIVER JE, WHITFIELD AE. 2016. The Genus Tospovirus: Emerging Bunyaviruses that Threaten Food Security. *Annual Review of Virology* 3: 101–124.

PAPPU HR, JONES RAC, JAIN RK. **2009**. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141: 2219–2236.

PLYUSNIN A, BEATY B, ELLIOTT RM, GOLDBACH R, KORMELINK R, LUNDKVIST Å, SCHMALJOHN CS, TESH RB. **2012**. *Bunyaviridae*. Elsevier Academic Press, London, UK.

POZZER L, BEZERRA IC, KORMELINK R, PRINS M, PETERS D, RESENDE RO, DE ÁVILA AC. **1999**. Characterization of a tospovirus isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Disease* 83: 345–350.

REIFSCHNEIDER FJB, CAFE AC, DUSI AN, KITAJIMA EW. **1989**. Brown pod, a disease caused by *Tomato spotted wilt virus* on peas in Brazil. *Tropical Pest Management* 3: 304–306

RESENDE RDO, POZZER L, NAGATA T, BEZERRA I, LIMA M, DE BRITO GIORDANO L, KITAJIMA E, DE ÁVILA A. **1996**. New tospoviruses found in Brazil. *Acta Horticulturae* 431: 78–89.

ROSELLÓ S, DÍEZ MJ, NUEZ F. **1996**. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The *Tomato spotted wilt virus*—a review. *Scientia Horticulturae* 67: 117–150.

SNIPPE M, WILLEM BORST J, GOLDBACH R, KORMELINK R. **2007**. *Tomato spotted wilt virus* Gc and N proteins interact in vivo. *Virology* 357: 115–123.

SPADOTTI DMA, LEÃO EU, ROCHA KCG, PAVAN MA, KRAUSE-SAKATE R, **2014**. First report of *Groundnut ringspot virus* in cucumber fruits in Brazil. *New Disease Reports* 29: 25.

TAKEDA A, SUGIYAMA K, NAGANO H, MORI M, KAIDO M, MISE K, TSUDA S, OKUNO T. **2002**. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Letters* 532: 75–79.

WEBSTER C, TURECHEK W, MELLINGER H, FRANTZ G, ROE N, YONCE H, VALLAD G, ADKINS S. **2011**. Expansion of *Groundnut ringspot virus* host and geographic ranges in solanaceous vegetables in peninsular Florida. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2011-0725-01-BR

WEBSTER CG, FRANTZ G, REITZ SR, FUNDERBURK JE, MELLINGER HC, MCAVOY E, TURECHEK WW, MARSHALL SH, TANTIWANICH Y, MCGRATH MT, DAUGHTREY ML, ADKINS S. **2015**. Emergence of *Groundnut ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus* in vegetables in Florida and the Southeastern United States. *Phytopathology* 105: 388–398.

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

ZHOU J, KANTARTZI SK, WEN RH, NEWMAN M, HAJIMORAD MR, RUPE JC, TZANETAKIS, IE. **2011**. Molecular characterization of a new tospovirus infecting soybean. *Virus Genes* 43: 289–295.