

Hipersensibilidade e Necrose Sistêmica em *Nicotiana benthamiana* Transformada com o Gene de Resistência *Sw-5* de Tomateiro

Douglas Lau¹, Julio Cezar F. de Oliveira², Elene Y. Lau¹ & Sérgio H. Brommonschenkel¹

¹Departamento de Fitopatologia/Bioagro, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa, MG; e-mail: shbromo@ufv.br; ²Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP

(Aceito para publicação em 26/01/2006)

Autor para correspondência: Sérgio H. Brommonschenkel

LAU, D., OLIVEIRA, J.C.F., YAMAZAKI LAU, E. & BROMMONSCHENKEL, S.H. Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene de resistência *Sw-5* de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 31:247-253. 2006.

RESUMO

O gene *Sw-5* do tomateiro confere resistência a várias espécies de tospovírus e codifica uma proteína contendo domínios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina. Tomateiros com *Sw-5* exibem reações necróticas nas folhas inoculadas com tospovírus. Estas reações e a estrutura da proteína *Sw-5* indicam que a resistência ocorre por meio do reconhecimento do patógeno e desencadeamento da resposta de hipersensibilidade. A capacidade de *Sw-5* de conferir resistência a tospovírus em tabaco selvagem (*Nicotiana benthamiana* Domin.) foi avaliada em plantas transgênicas. Uma construção com a seqüência aberta de leitura de *Sw-5* e sua região 3' não-traduzida sob controle do promotor 35S do CaMV foi utilizada para transformação de *N. benthamiana* via *Agrobacterium tumefaciens*. Plantas de progênies R1 foram inoculadas com um isolado de tospovírus e avaliadas quanto à ocorrência de reação de hipersensibilidade e resistência à infecção sistêmica. Em uma progênie com segregação 3:1 (resistente:suscetível), foi selecionada uma planta homozigota e sua progênie avaliada quanto ao espectro da resistência a tospovírus. Plantas com o transgene exibiram resposta de hipersensibilidade 48 h após a inoculação, sendo resistentes à infecção sistêmica. O fenótipo da resistência foi dependente do isolado viral e um isolado de *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) causou necrose sistêmica em todas as plantas inoculadas, enquanto que isolados de *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e um isolado relacionado a *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) ficaram restritos ao sítio de infecção. Comparações do espectro da resistência obtido neste trabalho com aquele observado em outros membros da família *Solanaceae* indicam que as vias de transdução de sinais e as respostas de defesa ativadas por *Sw-5* são conservadas dentro desta família e polimorfismos genéticos nas vias de transdução de sinais ou em componentes das respostas de defesa podem resultar em diferentes níveis de resistência.

Palavras-chave adicionais: resistência a vírus, expressão heteróloga, transdução de sinais.

ABSTRACT

Hypersensitive response and systemic necrosis in *Nicotiana benthamiana* transformed with the *Sw-5* resistance gene from tomato.

The tomato gene *Sw-5* confers resistance against tospovirus species and codes for a nucleotide binding site and leucine rich protein. Tomatoes with the *Sw-5* gene develop a necrotic reaction when mechanically inoculated with tospoviruses. The necrotic lesions on inoculated leaves of the resistant plants and the structure of the protein codified by *Sw-5* suggests that the resistance depends on recognition of the pathogen and activation of hypersensitive response (HR). The capacity of the *Sw-5* to confer resistance in wild tobacco (*Nicotiana benthamiana*) was evaluated in transgenic plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. The *Sw-5* ORF and its own 3' UTR region were placed under 35S promoter control. Plants of R1 progenies were inoculated with tospovirus and evaluated for local and systemic symptoms. In one progeny with 3:1 (resistant:susceptible) segregation ratio a homozygous plant was selected and the resistance spectrum of its progeny was evaluated. Transgenic plants showed hypersensitive response 48 h after inoculations and were resistant to tospovirus infection. The resistance was isolate-specific and a *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) isolate caused systemic necrosis in the transformed plants, while *Groundnut ringspot virus* (GRSV) isolates and one *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) related isolate was restricted to the inoculation site. Comparisons of the resistance spectrum with that observed in other members of the *Solanaceae* suggest that the signal transduction pathways and resistance responses triggered by *Sw-5* are conserved in *Solanaceae*, and the genetic polymorphism in the signal transduction pathways or defense response components may result in different resistance levels.

Additional keywords: virus resistance, heterologous expression, signal transduction.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Tospovirus* (família *Bunyaviridae*) têm sido descritas como agentes causais de doenças em

uma ampla gama de hospedeiros em regiões tropicais, subtropicais e de clima temperado (German *et al.*, 1992). Entre as espécies de tospovírus descritas, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV),

Groundnut ringspot virus (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) são capazes de infectar tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) e outras solanáceas causando a doença conhecida como “vira-cabeça” (Kurozawa & Pavan, 1997; Bezerra *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2002).

O gene *Sw-5* é originário do tomateiro selvagem *Lycopersicon peruvianum* (L.) Miller e confere resistência a várias espécies de tospovírus. Originalmente, a resistência mediada por *Sw-5* foi considerada dominante com penetrância incompleta (Stevens *et al.*, 1992; Boiteux & Giordano, 1993). Fenotipicamente, a resistência se manifesta pela ausência de sintomas, ou pelo aparecimento de lesões necróticas nas folhas inoculadas (Stevens *et al.*, 1992). Estudos envolvendo enxertia sugerem que *Sw-5* atua contendo o vírus no sítio de infecção (Lau, 2001).

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

Modelos propõem que as proteínas codificadas pelos genes *R* podem atuar como receptores diretos ou indiretos de proteínas codificadas pelos patógenos ou ainda, como sensores detectando alterações celulares provocadas por proteínas do patógeno (Nimchuk *et al.*, 2003; Belkhadir *et al.*, 2004). Em consequência deste reconhecimento, a ativação de vias de transdução de sinais relacionadas a diversos mecanismos de defesa levam à restrição do patógeno no sítio de infecção (Baker *et al.*, 1997; Somssich & Hahlbroch, 1998). **As estratégias de defesa de plantas a patógenos incluem** o aumento intracelular da concentração de espécies reativas de oxigênio, a lignificação e o fortalecimento de paredes celulares, a produção de substâncias antimicrobianas como as fitoalexinas e a indução da expressão de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), bem como de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico, responsáveis pela ativação de respostas de defesa em células adjacentes (*Localized Acquired Resistance*, LAR) e tecidos mais distantes do sítio primário de infecção na planta (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) (Hutcheson, 1998; Durrant & Dong, 2004). A resposta de resistência pode, muitas vezes, ser visualizada macroscopicamente na forma de lesões necróticas restritas ao sítio de infecção (Resposta de Hipersensibilidade, HR) (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

O gene *Sw-5* confere resistência não apenas em espécies e cultivares de tomateiro, mas também em outras espécies da família *Solanaceae* como o fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e a berinjela (*Solanum melongena* L.) (Brommonschenkel *et al.*, 2000; Lau, 2001; Picoli, 2000), porém não é capaz de conferir resistência em alface

(*Lactuca sativa* L.) (Karasawa, 2001; Yamazaki, 2001). Em fumo, o espectro da resistência é mais restrito em comparação com tomateiro (Lau, 2001). A funcionalidade de um gene *R* em sistema heterólogo é considerada evidência da conservação das vias de transdução de sinais ativadas por este gene. Ao menos em solanáceas, estas vias devem ser conservadas, conforme verificado pela funcionalidade do gene *N* de fumo em tomate (Whitham *et al.*, 1996), *Pto* de tomate em *Nicotiana benthamiana* Domin. (Rommens *et al.*, 1995) e *Cf-9* de tomate em fumo e batata (*Solanum tuberosum* L.) (Hammond-Kosack *et al.*, 1998). A conservação das vias de transdução de sinais pode estar restrita a plantas botanicamente relacionadas, sendo este fenômeno denominado funcionalidade taxonômica restrita (*restricted taxonomic functionality*, RTF) (Tai *et al.*, 1999). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a funcionalidade do gene *Sw-5* em fumo selvagem (*N. benthamiana*) e comparar o espectro da resistência com o observado em outras espécies de solanáceas.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados virais e inoculação

Os isolados de tospovírus V1-3 (TCSV) (AF282982), Cb (GRSV) (AF251271) e AL (GRSV) (AF513219) e V2-2 utilizados neste trabalho são originários do Brasil e fazem parte da coleção do Laboratório de Genética da Interação Planta-Patógeno (BIOAGRO/UFV), sendo sua identificação baseada no sequenciamento do gene *N* (nucleocapsídeo). O gene *N* do isolado V2-2 foi apenas parcialmente sequenciado (seqüência não depositada no GenBank), sendo este isolado relacionado à espécie CSNV (79% de identidade, 450nts) (Lau, 2001).

Para fins de inoculação, o inóculo original, mantido a -80 °C, foi previamente multiplicado em plantas de *N. tabacum* ‘Havana 425’. Folhas infectadas foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,01 M e carborundum 600 mesh. O extrato foi esfregado sobre folhas de plantas saudáveis de *N. benthamiana* com auxílio de gaze.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação ou câmara de crescimento e avaliadas a cada dois dias por um período de 14 dias, observando-se o desenvolvimento de sintomas locais e sistêmicos.

Transformação genética de *N. benthamiana*

Fragmentos foliares de *N. benthamiana* foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens* com o clone pGPP63. Este clone é constituído da estirpe desarmada LBA4404 de *A. tumefaciens* contendo o vetor binário pBI121, no qual o gene GUS foi substituído pela seqüência aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) do gene *Sw-5* (oriunda da linhagem SW99-1 de *L. esculentum*). Nesta construção a ORF *Sw-5* está sob o controle do promotor 35S do CaMV (*Cauliflower mosaic virus*) e contém a sua respectiva região 3’ não-traduzida (3’NTR) (Figura 1) (Lima, 2001; Yamazaki, 2001).

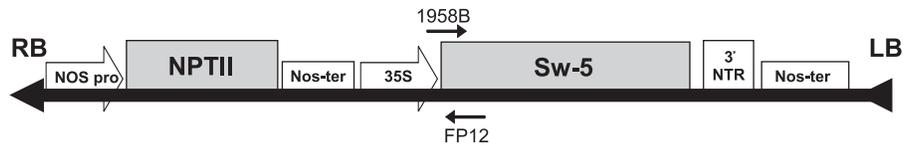


FIG. 1 - Representação diagramática do T-DNA da construção pGPP63, derivada do vetor pBI121. RB, borda direita; NOS pro, promotor do gene *nos* de *Agrobacterium tumefaciens*; NPT II, gene da *neomicina fosfotransferase II*, que confere resistência a canamicina; NOS ter, terminador do gene *nos*; 35S, promotor do RNA 35S do CaMV; Sw-5, ORF Sw-5; 1958B e FP12, oligonucleotídeos que pareiam na região 5' do gene *Sw-5*; 3' NTR, região 3' não traduzida do gene *Sw-5*; LB, borda esquerda.

Determinação da presença do transgene

A presença do gene *Sw-5* nas plantas transformadas foi determinada via PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a sequência transgênica. O DNA das plantas foi extraído de acordo com protocolo de Fulton *et al.* (1995). A reação de PCR consistiu em 100-200 ng de DNA genômico, 10 mM Tris-HCl pH8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 10 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos 1958B (5'-GGT GAA CTT CCC GGG AGA AAA TGG CTG-3') e FP12 (5'-AGG ATT TGT AGT ACG TCT CAA CTT G-3'), 2 a 5 unidades da enzima Taq DNA polimerase e água estéril (Milli-Q) para atingir um volume final de 25 µL. Os oligonucleotídeos 1958B e FP12 anelam na região 5' do gene *Sw-5* (Figura 1), permitindo a amplificação de uma sequência de 1125 pb. Após desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, a amplificação constituiu-se de 40 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94 °C, anelamento por 1 min a 52 °C e extensão a 72 °C por 2 min, com uma extensão final a 72 °C por 5 min. O produto da reação foi visualizado sob luz ultravioleta após corrida eletroforética a 90V por 2 h em gel de agarose 1% (TAE 1X) contendo brometo de etídeo.

Análise de segregação e funcionalidade do transgene

As plantas transformadas (R0) foram inoculadas com o isolado V2-2. Aquelas que exibiram reações locais necróticas e não manifestaram sintomas sistêmicos (portanto consideradas resistentes) foram autofecundadas. As sementes oriundas da autofecundação das plantas R0 que exibiram HR foram coletadas e utilizadas nos experimentos de análise de segregação. Aproximadamente 20 plantas de cinco progêneses R1 foram inoculadas com o isolado V2-2 e avaliadas quanto à ocorrência de HR nas folhas inoculadas, até seis dias após a inoculação. O ajuste das proporções de plantas resistentes: suscetíveis ao modelo genético hipotetizado foi avaliado pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Plantas resistentes de uma progênie que apresentou segregação indicativa de uma única inserção foram autofecundadas e as progêneses R2 foram inoculadas, visando identificar plantas R1 homozigotas. Uma planta R1 homozigota foi selecionada e o espectro da resistência avaliado em sua descendência mediante a inoculação com quatro isolados de tospovírus (V1-3, Cb, AL e V2-2).

RESULTADOS

Transformação genética de *N. benthamiana* e análise de segregação do transgene

Dos 20 transformantes primários (R0) aclimatados em casa-de-vegetação e inoculados com o isolado viral V2-2, três apresentaram sintomas idênticos às plantas não transformadas de *N. benthamiana*, consistindo em lesões cloróticas em anel no sítio de inoculação e infecção sistêmica caracterizada por clorose e necrose nas nervuras. Dezesete plantas manifestaram reações locais típicas de HR. Destas plantas, porém, 11 manifestaram sintomas sistêmicos até a época do florescimento. Estes sintomas foram de natureza necrótica, diferindo dos sintomas observados em plantas não transformadas.

Cincoprogenies R1, geradas a partir da autofecundação de plantas R0 que não sofreram infecção viral sistêmica, foram avaliadas quanto à segregação da resistência. Considerando o nível de significância de 5% pelo teste de χ^2 , as progêneses oriundas de B2, B5 e B9 apresentaram padrão de segregação indicativo de uma única inserção do transgene (Tabela 1). Baseado na segregação da resistência em progêneses R2 uma planta R1 homozigota (todos os descendentes resistentes) foi selecionada (B5-5) e sua progênie utilizada nos ensaios de determinação do espectro da resistência. Por meio de PCR, utilizando os oligonucleotídeos 1958B e FP12, foi amplificado um fragmento de 1125 pb correspondente à região 5' do gene *Sw-5*, confirmando a presença do transgene em B5-5 (Figura 2).

Análise do espectro da resistência

A progênie da planta homozigota B5-5 foi inoculada com os quatro isolados de tospovírus. Das 40 plantas avaliadas (dez para cada isolado), todas exibiram sintomas locais necróticos dois dias após a inoculação (Figura 3B, Tabela 2). As lesões induzidas pelo isolado V1-3 apresentaram um aspecto distinto das demais, não sendo tão evidentes e alternando regiões necróticas com áreas cloróticas. Nas plantas não transformadas, os sintomas locais típicos da infecção viral só foram observados sete dias após a inoculação. Estes foram de natureza clorótica, muitas vezes na forma de anéis concêntricos (Figura 3A). Dez dias após a inoculação, todas as plantas não transformadas exibiam sintomas sistêmicos típicos de infecção por

TABELA 1 – Segregação da resistência ao isolado de tospovírus V2-2 em progênies oriundas da autofecundação de plantas de *N. benthamiana* transformadas com a construção pGPP63

Progênie	Fenótipos		Hipótese**	Proporção esperada		χ^2	P%
	Observados*			R	S		
	R	S					
B2	15	5	3:1	15	5	0	100
B5	15	5	3:1	15	5	0	100
B9	12	8	3:1	15	5	2,4	12,13
B13	8	11	3:1	14,25	4,75	10,97	0,09
B18	9	8	3:1	12,75	4,25	4,41	3,57

*R - presença de HR nas folhas inoculadas; S - ausência de HR nas folhas inoculadas.

**Considerando uma inserção do transgene e dominância completa.

tospovírus: clorose no limbo e nervuras, leve necrose em alguns pontos da haste e deformação foliar (Figura 3D). Nas plantas transformadas houve diferenças quanto à capacidade de restrição da infecção sistêmica dos diferentes isolados. Plantas inoculadas com os isolados V2-2, AL e Cb apresentaram apenas sintomas locais, enquanto todas as plantas inoculadas com o isolado V1-3 apresentaram sintomas sistêmicos (Figura 3C, Tabela 2), de natureza necrótica e, portanto, diferentes daqueles observados em plantas não transformadas.

DISCUSSÃO

O gene *Sw-5* do tomateiro foi funcional em *N. benthamiana*. Esta funcionalidade foi evidenciada por dois aspectos que diferenciam as plantas transformadas das não transformadas: presença de lesões locais necróticas nas folhas inoculadas e capacidade de contenção do vírus no sítio primário de infecção. Lesões necróticas no sítio de infecção, visualizadas pouco tempo após a inoculação, caracterizam a resposta de hipersensibilidade, um fenômeno que envolve o reconhecimento de elicitores do patógeno e a ativação de vias de transdução de sinais que conduzem às respostas de defesa da planta (Staskawicz *et al.*, 1995; Nimchuk *et al.*, 2003).

A funcionalidade da construção pGPP63 em *N. benthamiana*, em acordo com resultados obtidos em fumo (Yamazaki, 2001), demonstra que a ORF do gene *Sw-5* utilizada na transformação contém toda a informação necessária à codificação de uma proteína capaz de ativar o processo de defesa. Assim, as seqüências de DNA adjacentes à ORF presentes no clone cosmídeo TC134-8 (inserto de aproximadamente 20 Kb), utilizado anteriormente na transformação de plantas de tomate, fumo e berinjela (Brommonschenkel *et al.*, 2000; Picoli, 2000), não são requeridas para o desencadeamento da resposta de hipersensibilidade e resistência a tospovírus.

A funcionalidade de *Sw-5* em *N. benthamiana* indica que as vias de sinalização e os mecanismos de defesa ativados pela proteína de resistência estão presentes nesta planta. Além do tomateiro, planta da qual o gene foi clonado, esta é a terceira espécie na qual se demonstra a conservação das

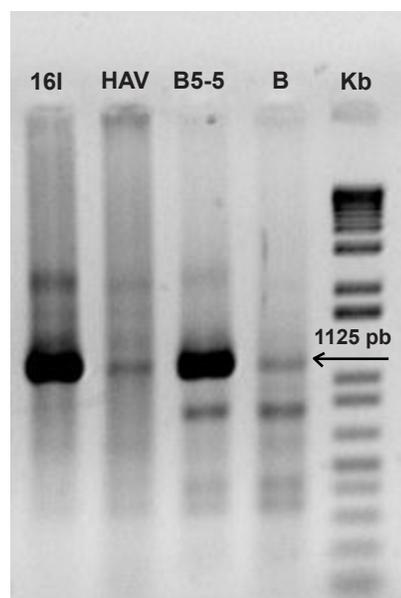


FIG. 2 - Confirmação da presença de *Sw-5* em B5-5 por meio de PCR. A presença do transgene foi verificada utilizando-se os oligonucleotídeos 1958B e FP12 que pareiam na região 5' do transgene. 16I, linhagem de *Nicotiana tabacum* com o clone cosmídeo TC134-8 que contém o gene *Sw-5*; HAV, planta de *N. tabacum* não transformada; B5-5, planta de *N. benthamiana* transformada com o clone pGPP63. B, planta de *N. benthamiana* não transformada; Kb, marcador 1 Kb Plus DNA Ladder.

vias de defesa ativadas por *Sw-5*. As outras duas espécies nas quais *Sw-5* foi funcional, *N. tabacum* e berinjela (Lau, 2001; Spassova *et al.*, 2001; Picoli, 2000), também pertencem à família *Solanaceae*. Esta conservação pode ser restrita a esta família, uma vez que plantas de alface (família *Asteraceae*) transformadas com este gene são suscetíveis a tospovírus (Karasawa, 2001; Yamazaki, 2001). A conservação das vias de defesa dentro da família *Solanaceae* está bem demonstrada para outros genes de resistência, os quais foram transferidos para outras espécies por meio de transformação estável: gene *N* de fumo para tomate (Whitham *et al.*, 1996), *Pto* de tomate para *N. benthamiana* e *N. tabacum* (Rommens *et al.*, 1995; Thilmoney *et al.*, 1995), *Cf-9* de tomate para fumo e batata (Hammond-Kosack *et al.*, 1998) e *Bs2* de pimentão para tomate (Tai *et al.*, 1999). Técnicas de expressão transiente demonstraram que os genes *Bs2* de pimentão e *Cf-4* e *Cf-9* de tomateiro são capazes de induzir resposta de hipersensibilidade em diversas solanáceas (Tai *et al.*, 1999; Van der Hoorn *et al.*, 2000).

A conservação dos componentes das vias de defesa ativadas por um gene de resistência permite supor que existam homólogos deste gene em diferentes espécies de plantas, mesmo que por meio de modificações ao longo da evolução estes tenham adquirido outras especificidades e sejam incapazes de ativar o processo de defesa para um mesmo patógeno. A presença de homólogos dentro da família *Solanaceae* (tomateiro, fumo, batata e berinjela) foi demonstrada para o gene *Bs2* (da mesma classe que

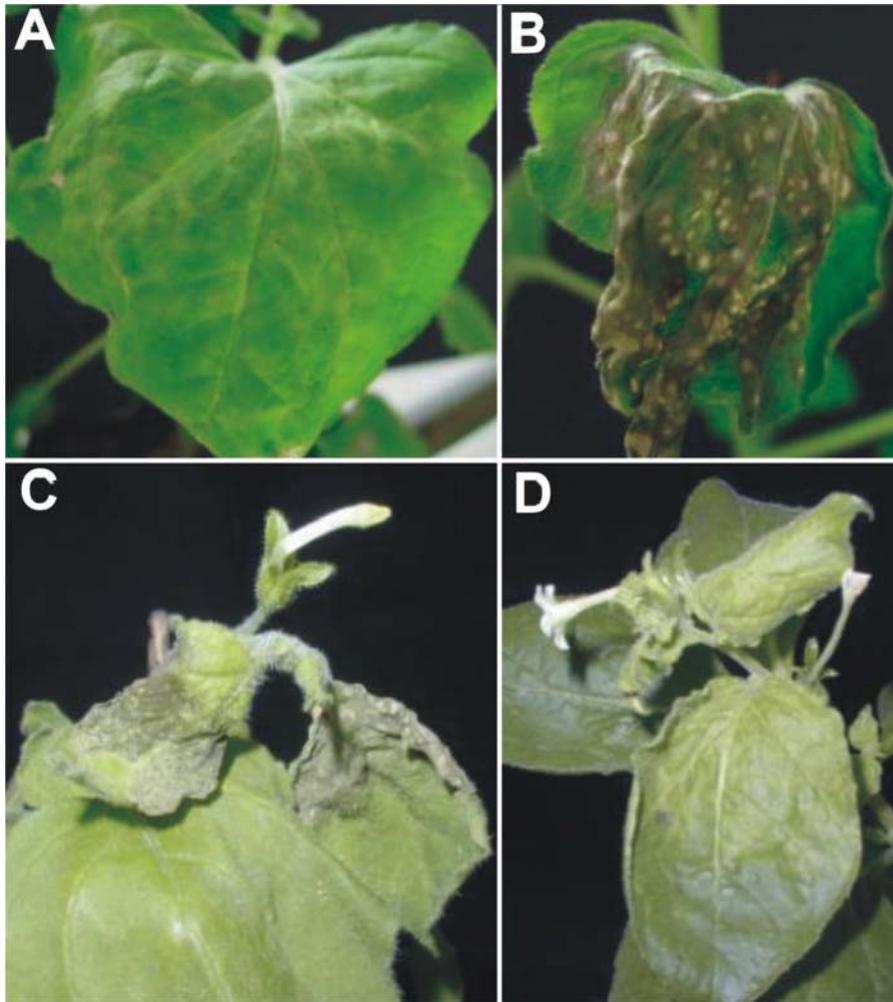


FIG. 3 - Sintomas observados em plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com tospovírus. **A.** Lesões cloróticas em folhas inoculadas de plantas não transformadas. **B.** Resposta de hipersensibilidade em folha de planta transformada com *Sw-5*. **C.** Necrose sistêmica em planta transformada com *Sw-5*. **D.** Clorose e deformação foliar, sintomas sistêmicos induzidos por tospovírus em plantas não transformadas.

Sw-5), originário da pimenta (*Capsicum chacoense* Hunz.) e capaz de desencadear HR nestas espécies (Tai *et al.*, 1999). A presença de homólogos de *Sw-5* foi demonstrada em *Capsicum* spp. (Jahn *et al.*, 2000), no entanto, estes não conferem resistência a tospovírus.

A análise da evolução de genes de resistência dentro da família *Solanaceae* mostra que a especificidade de reconhecimento do patógeno pode estar evoluindo rapidamente, enquanto mantém-se conservada a capacidade de desencadear as respostas de defesa. Esta hipótese é baseada na observação de que genes homólogos, ocupando a mesma posição no genoma, podem conferir resistência a patógenos diferentes (Grube *et al.*, 2000). Em diferentes espécies de tomateiro, genes homólogos podem ser amplificados por meio de PCR com oligonucleotídeos baseados na sequência de *Sw-5* (Lima, 2001). Utilizando-se oligonucleotídeos que pareiam na região 5' de *Sw-5*, observa-se a amplificação

de fragmentos de tamanho esperado em *N. tabacum*, *N. benthamiana*, berinjela e batata (dados não mostrados).

A comparação entre o espectro da resistência conferida por *Sw-5* em *N. benthamiana* com o observado em tomate, berinjela e *N. tabacum* indica haver uma equivalência nestes sistemas. O isolado VI-3, causador de necrose sistêmica em *N. benthamiana*, induz necrose sistêmica em tomateiro heterozigoto para o gene *Sw-5* e também causa infecção sistêmica em fumo transgênico (Lau, 2001). Além disso, as lesões observadas nas folhas inoculadas com VI-3, que se distinguem da HR bem definida observada para os outros isolados, podem ser comparadas às lesões necróticas com anéis concêntricos observadas em berinjela (Lima *et al.*, 2000). Assim, em sistemas heterólogos parece haver um deslocamento da resistência para níveis mais baixos, em que a tendência de um isolado em causar infecção sistêmica em plantas com *Sw-5* torna-se mais pronunciada. Um dos fatores

TABELA 2 - Frequência dos diferentes sintomas exibidos por plantas de *Nicotiana benthamiana* não transformadas e plantas da progênie B5-5 inoculadas com quatro isolados de tospovírus

Sintomas	Plantas inoculadas							
	<i>N. benthamiana</i> (Não transformada)				B5-5 (<i>Sw-5/Sw-5</i>)			
	Isolados				Isolados			
	V1-3	V2-2	AL	Cb	V1-3	V2-2	AL	Cb
HR	0/7*	0/10	0/5	0/6	10/10	10/10	10/10	10/10
Lesões cloróticas/ Mosaico	7/7	10/10	5/5	6/6	0/10	0/10	0/10	0/10
Necrose sistêmica	0/7	0/10	0/5	0/6	10/10	0/10	0/10	0/10

* Plantas com sintomas / Total de plantas inoculadas.

que pode afetar a resistência pode ser o nível de expressão do transgene, em que contribuem a posição de inserção deste no genoma e os elementos cis-regulatórios. O aumento da resistência verificado em uma progênie de fumo com duas inserções de *Sw-5* sob controle do promotor 35S reforça a hipótese da relação entre nível de expressão e resistência (Yamazaki, 2001). Ainda quanto ao hospedeiro, a menor funcionalidade da proteína em sistema heterólogo e respostas de defesa menos eficientes devem ser consideradas. Estudos realizados em fumo (Lau, 2001; Yamazaki, 2001), em que plantas transformadas foram completamente suscetíveis a determinados isolados de tospovírus, não sendo observada HR, reforçam a hipótese de que podem existir deficiências na funcionalidade da proteína *Sw-5* em sistemas heterólogos. Esses resultados podem ser explicados pela menor eficácia da interação da proteína *Sw-5* com os demais componentes das vias de transdução de sinais que ativam as respostas de defesa nesses sistemas. Esta hipótese é corroborada pela observação de que para alguns genes de resistência, dependendo da planta em que são expressos, diferentes quantidades da molécula elicitora são necessárias para o desencadeamento de HR. O gene *Cf-9*, por exemplo, é capaz de desencadear HR em *Brassica napus* L., mas somente se quantidades do peptídeo elicitor *Avr9* muito superiores às utilizadas em tomate (de onde o gene é originário) forem infiltradas nos tecidos (Hennin *et al.*, 2001).

Em resumo, os resultados obtidos para *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene *Sw-5* indicam que a ORF deste gene contém toda informação necessária para codificar uma proteína capaz de desencadear o processo de defesa a tospovírus neste sistema heterólogo. Além disso, *N. benthamiana*, assim como outros membros da família *Solanaceae*, contém os componentes das vias de transdução de sinais e elementos de resposta de defesa a tospovírus ativadas pela proteína *Sw-5*. A comparação do espectro da resistência observado em *N. benthamiana* com o observado para outras solanáceas corrobora a hipótese de que polimorfismo genético nos componentes das vias de transdução de sinais pode resultar em diferentes níveis de resistência, mesmo no caso de genes de efeito principal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B. & DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276:726-733. 1997.
- BELKHADIR, Y., SUBRAMANIAM, R. & DANGL, J.L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* 7:391-399. 2004.
- BENDAHMANE, A., KANYUKA, K. & BAULCOMBE, D.C. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11:781-791. 1999.
- BEZERRA, I.C., RESENDE, R.O., POZZER, L., NAGATA, T., KORMELINK, R., & ÁVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology* 89:823-830. 1999.
- BOITEUX, L.S. & GIORDANO, L.B. Genetic basis of resistance against two Tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71:151-154. 1993.
- BROMMONSCHENKEL, S.H., FRARY, A., FRARY, A. & TANKSLEY, S.D. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1130-1138. 2000.
- DURRANT, W.E. & DONG, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185-209. 2004.
- FULTON, T.M., CHUNWONGSE, J. & TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13:207-209. 1995.
- GERMAN, T.L., ULLMAN, D.E. & MOYER, J.W. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology* 30:315-348. 1992.
- GRANT, M.R., GODIARD, L., STRAUBE, E., ASHFIELD, T., LEWALD, J., SATTLER, A., INNES, R.W. & DANGL, J.L. Structure of the Arabidopsis *RPML* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269:843-846. 1995.
- GRUBE, R.C., RADWANSKI, E.R. & JAHN, M. Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae. *Genetics* 155:873-887. 2000.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791. 1996.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., TANG, S., HARRISON, K. & JONES, J.D.G. The tomato *Cf-9* disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product *Avr9*. *Plant Cell* 10:1251-1266. 1998.
- HENNIN, C., HÖFTE, M. & DIEDERICHSEN, E. Functional expression of *Cf-9* and *Avr9* genes in *Brassica napus* induces enhanced resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:1075-1085. 2001.
- HUTCHESON, S.W. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36:59-90. 1998.
- JAHN, M. K., PARAN, I., HOFFMAN, K., RADWANSKI, E. R., LIVINGSTONE, K. D., GRUBE, R.C., AFTERGOOT, E., LAPIDOT, M. & MOYER, J. Genetic mapping of the *Tsw* locus for resistance to the Tospovirus *Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum*

- spp. and its relationship to the *Sw-5* gene for resistance to the same pathogen in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:673-682. 2000.
- KARASAWA, M. Transformação de alface com o gene *Sw-5* originário de tomateiro e avaliação da resistência das plantas transgênicas a tospovírus. (Dissertação de Mestrado) Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- KUROZAWA, C., PAVAN, M.A. Doenças das Solanáceas. In: KIMATI, H., AMORIN, L. BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (Eds.) Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. v. 2. pp. 665-675.
- LAU, D. Análise de fatores que influenciam a resistência a tospovírus conferida pelo gene *Sw-5* em tomateiro e tabaco. (Dissertação de Mestrado) Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- LIMA, G.S.A. Resistência a tospovírus, clonagem e caracterização molecular de alelos do loco *Sw-5* em espécies de *Lycopersicon*. (Tese de Doutorado) Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- LIMAG.S.A., PICOLI, E.A.T., LAU, D., BROMMONSCHENKEL, S.H., OTONI, W.C. & ZERBINI, F.M. Signal transduction pathways mediated by the *Sw-5* are conserved in eggplant. *Virus Reviews & Research* 5:191-192. 2000. (Abstract)
- LIMA, G.S.A., LAU, D., PICOLI, E.A.T., ASSUNÇÃO, I.P., BROMMONSCHENKEL, S.H. & OTONI, W.C. Reação de genótipos de berinjela a quatro espécies de tospovírus. *Summa Phytopathologica* 28:242-247. 2002.
- MARTIN, G.B., BOGDANOVA, A.J. & SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54:23-61. 2003.
- MILLIGAN, S.B., BODEAU, J., YAGHOUBI, J., KALOSHIAN, I., ZABEL, P., & WILLIAMSON, V.M. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1319. 1998.
- NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT III, B.F. & DANGL, J.L. Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* 37:579-609. 2003.
- ORI, N., ESHED, Y., PARAN, I., PRESTING, G., AVIV, D., TANKSLEY, S., ZAMIR, D., & FLUHR, R. The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell* 9:521-532. 1997.
- PICOLI, E.A.T. Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embú) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. (Dissertação de Mestrado) Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000.
- ROMMENS, C.M.T., SALMERON, J.M., OLDROYD, G.E.D. & STASKAWICZ, B.J. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. *Plant Cell* 7:1537-1544. 1995.
- SALMERON, J.M., OLDROYD, G.E.D., ROMMENS, C.M.T., SCOFIELD, S.R., KIM, H.-S., LAVELLE, D.T., DAHLBECK, D. & STASKAWICZ, B.J. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell* 86:123-133. 1996.
- SPASSOVA, M.I., PRINS, T.W., FOLKERTSMA, R.T., KLEIN-LANKORST, R.M., HILLE, J., GOLDBACH, R.W. & PRINS, M. 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. 2001.
- SOMSSICH, I.E. & HAHLBROCK, K. Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3:86-90. 1998.
- STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J. ELLIS, J.G. & JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268:661-667. 1995.
- STEVENS, M.R., SCOTT, S.J. & GERGERICH, R.C. Inheritance of a gene for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59:9-17. 1992.
- TAI, T.H., DAHLBECK, D., CLARK, E.T., GAJIWALA, P., PASION, P., WHALEN, M.C., STAHL, R.E. & STASKAWICZ, B.J. Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 96:14153-14158. 1999.
- THILMONY, R.L., CHEN, Z., BRESSAN, R.A. & MARTIN, G.B. Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing *avrPto*. *Plant Cell* 7:1529-1536. 1995.
- VAN DER HOORN, R.A.L., LAURENT, F., ROTH, R. & DE WIT, J.G.M. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of *Avr9/Cf-9*-induced and *Avr4/Cf-4*-induced necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:439-446. 2000.
- YAMAZAKI, E. Resistência de tabaco e alface transformados com o gene *Sw-5*, sob o controle do promotor 35S, a três espécies de tospovírus. (Dissertação de Mestrado) Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- WHITHAM, S., McCORMICK, S. & BAKER, B. The *N* gene of tobacco confers resistance to *Tobacco mosaic virus* in transgenic tomato. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 93:8776-8781. 1996.