UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS BOTUCATU

POTYVIRUS: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ESPÉCIES EM PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS A CULTURA DO PIMENTÃO, AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACE E ANÁLISE SUBCELULAR DO eIF4E E DE PROTEÍNAS DO *Lettuce mosaic virus*

MÔNIKA FECURY MOURA

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Abril – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS BOTUCATU

POTYVIRUS: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ESPÉCIES EM PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS A CULTURA DO PIMENTÃO, AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACE E ANÁLISE SUBCELULAR DO eIF4E E DE PROTEÍNAS DO *Lettuce mosaic virus*

MÔNIKA FECURY MOURA

Orientadora: Prof[a]. Dra. Renate Krause Sakate

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Abril – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO – SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Moura, Mônika Fecury, 1979-
M929p Potyvirus: caracterização parcial de espécies em plantas daninhas associadas a cultura do pimentão, avaliação de genótipos de alface e análise subcelular do eIF4E e de proteínas do *Lettuce mosaic virus* / Mônika Fecury Moura. – Botucatu : [s.n.], 2013
viii, 71 f. : ils. color., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2013
Orientador: Renate Krause Sakate
Inclui bibliografia

1. *Lettuce mosaic virus*. 2. Alface. 3. Potyvirus. 4. Erva daninha. 5. eIF4E. 6. Proteínas. I. Sakate, Renate Krause. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: **"POTYVIRUS: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ESPÉCIES EM PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS A CULTURA DO PIMENTÃO, AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACE E ANÁLISE SUBCELULAR DO eIF4E E DE PROTEÍNAS DO Lettuce mosaic virus"**

ALUNA: MÔNIKA FECURY MOURA

ORIENTADOR: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

Aprovado pela Comissão Examinadora

Renate Krause Sakate

PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

PROF. DR. IVAN DE GODOY MAIA

PROF. DR. VALDIR ATSUSHI YUKI

PROF. DR. ROMULO FUJITO KOBORI

Data da Realização: 18 de abril de 2013.

AGRADEÇO

À DEUS

&

DEDICO

Com muito amor a pessoa que sempre me incentivou a buscar pelos meus sonhos e que nunca deixou de me apoiar: Minha mãe Rosária.

Dedico também ao meu Pai (Rômulo), meu irmão (Bernardo) e minha sobrinha (Mariana).

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos PDSE que possibilitou executar parte do meu doutorado no Institut National de la Recherche Agronomique em Bordeaux.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos ao longo do meu doutorado no Brasil.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agronômicas – Campus de Botucatu, assim como ao Departamento de Defesa Fitossanitária pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

Ao Institut National de la Recherche Agronomique de Bordeaux (França) pela concessão do uso das suas dependências para efetuar os experimentos do projeto.

À Profa. Renate Krause Sakate pela orientação e apoio ao longo do doutorado. Obrigada pela confiança e estímulo na realização do meu doutorado sanduíche em Bordeaux.

À Dra. Sylvie German-Retana pela paciência, boa vontade e gentileza durante o período em que estive sob sua orientação em Bordeaux.

Ao Prof. Norberto da Silva por ceder as sementes de alface que foram estudadas no trabalho e pela paciência todas as vezes em que fui tirar dúvidas.

Ao Prof. Marcelo Agenor Pavan pela ajuda e contribuições neste trabalho.

Ao Prof. Ivan Maia pelo auxílio nos experimentos no início do doutorado.

Ao Prof. Antonio Carlos Maringoni pelos conselhos e estímulo.

Aos professores Edson Luiz Furtado e Marli Minhoni pela formação e ensinamentos.

Ao Agrônomo Gilberto Wassano cuja ajuda foi importante nos trabalhos de coleta em Lins (SP).

Aos colegas de laboratório: Bruno de Marchi, Cristiane Melo, Daiana Bampi, David Spadotti, Denise Nozaki, Evelynne Leão, Gerson Suzuki, Isabel Hoffmann (A melhor estagiária que tive), Julio Marubayashi, Kelly Rocha, Késsia Pantoja, Leonardo Barbosa, Letícia Moraes, Leysimar Pitzr, Milena Leite e Vitor Imaizumi. Foi um prazer poder trabalhar no mesmo laboratório que vocês.

Aos colegas do departamento de Defesa Fitossanitária: Adriana Itako, Djanira Negrão, Julio César, Juan Sierra, Karina Tumura, Marcelo Soman, Maysa Areas, Paula Leite, Ricardo Gonçalves, Ronaldo Caravieri e Tadeu Júnior. Lembrarei sempre dos momentos compartilhados, cheios de risadas e conversas.

Às minhas amigas Karolina Dória e Tatiana Mituti: ao chegar em Botucatu não poderia imaginar que encontraria amigas tão companheiras como vocês. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos de Belém: Priscila Fagundes, Luciana Albuquerque, Rita dos Anjos, Mário Carvalho e Keila Negrão.

Aos meus amigos Fábio Araújo e Bianca Reis Pires pela companhia on line durante os meses que estive em Bordeaux. Vocês me ajudaram muito.

Aos colegas que conheci em Bordeaux: Anais Graveleau, Amandine Barra, Aurélie Bailly-Poque, Benjamin, Mamadou Diallo, Martin Mecchia, Sandra Dubes, Sylvain Poque e Stefanie Halle. Em especial à Maud Sorel, Mehraj e Sevda Abbasov e Daniel Garcia.

Aos meus ex-orientadores e sempre conselheiros Helen Sotão e Luis Poltronieri.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, em especial ao Paulinho, Fátima, Domingos, Nivaldo, Norberto.

Aos pesquisadores e técnicos do INRA que auxiliaram no meu trabalho: Luc Sofer, Brigitte Batailler, Marie-Christine Houvenaghel, Geneviève Roudet-Tavert, Amandine Bordat e Laurence Svanella-Dumas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS e TABELAS……	VII
1. RESUMO……	1
2. SUMMARY……	3
3. INTRODUÇÃO……..	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA……	7
4.1 Principais características do gênero *Potyvirus*……	7
4.2 O fator de tradução eucariótico 4E e a resistência aos potyvirus.....	9
4.3 A resistência da alface ao LMV……	12
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……...	15
CAPÍTULO 1……...	21
Caracterização parcial de um potyvirus infectando Trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) no Brasil……...	21
RESUMO……..	22
ABSTRACT……..	23
INTRODUÇÃO……	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……	31
CAPÍTULO 2……	34
Solanum americanum: reservatório de *Potato virus Y* e *Cucumber mosaic virus* em áreas de cultivo de pimentão.....	34
ABSTRACT……..	35
RESUMO……..	36
INTRODUCTION……	37
REFERENCES……	41
CAPÍTULO 3……	43
Comportamento de genótipos de alface ao LMV e caracterização do alelo eIF4E……	43

RESUMO…… 44
ABSTRACT…… 45
INTRODUÇÃO…… 46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS…… 51
CAPÍTULO 4…….. 54
Estudo *in vivo* da localização subcelular da proteína CI e seus parceiros virais VPg, P3NPIPO e do fator de tradução eucariótico eIF4E..... 54
RESUMO……..…… 55
1. INTRODUÇÃO…….. 56
2. MATERIAL E MÉTODOS…….. 57
2.1 Construção dos plasmídeos…… 57
2.2 Agroinfiltração dos vetores binários em *Nicotiana benthamiana*..... 59
2.3 Inoculação do LMV-GFP e LMV-mCherry em *N. benthamiana* e alface cultivar Trocadero…….....…… 60
2.4 Confirmação da fusão proteíca por Western Blot..... 60
2.5 Microscopia confocal…… 61
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO…….. 61
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…… 69

LISTA DE FIGURAS e TABELAS

CAPÍTULO Página

Figura 1 - Esquema do genoma dos potyvirus..... 8

Figura 2 - Presumíveis modelos de interação do fator de tradução eucarióticos 4E..... 11

Tabela 1 – Diferenças entre a seqüência de nucleotídeos verificada nos três alelos eIF4E descritos em alface..... 14

CAPÍTULO 1..... 21

Figura 1 – Planta de trapoeraba infectada com CMV e potyvirus partícula viral observada em microscopia eletrônica de transmissão..... 25

Tabela 1 – Sintomatologia observada dos isolados em diferentes plantas hospedeiras 26

Figura 2 – Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 5.0 para a região codificadora para proteína capsidial do potyvirus..... 28

Figura 3 – Árvores filogenéticas das proteínas CI e Nib do potyvirus da trapoeraba..... 29

CAPÍTULO 2..... 34

Figure 1 – Mosaic symptoms on *Solanum americanum*…….. 37

Figure 2 - Electron micrographs of potyvirus particle and presumed isometric particles from cucumovirus…… 38

Figure 3 - Phylogenetic tree for the coding region of the coat protein (PVY)……. 39

Figure 4 - Phylogenetic tree for the coding region used was the capsid protein (CMV)……. 40

CAPÍTULO 3..... 43

Figura 1 - Sintomas de mosaico tardio observados nos genótipos de alface

169501C e 162499..... 48
Figura 2 - Alinhamento parcial para a região codificadora do fator de tradução eucariótico eIF4E nas alfaces analisadas..... 49

Página

CAPÍTULO 4..... 54
Figura 1 – Esquema utilizado para obtenção do fragmento completo do gene P3NPIPO..... 58
Figura 2 – Localização da proteína CI-GFP em fumo e alface..... 62
Figura 3 – Localização das proteínas CI-GFP e P3N-PIPO-RFP..... 64
Figura 4 – Localização das proteínas CI-GFP e VPg-RFP..... 66
Figura 5 – Localização da proteína CI-GFP do fator $4E^1$-RFP..... 67

1. RESUMO

Os potyvírus constituem cerca de 90% das espécies conhecidas da família *Potyviridae*. No Brasil ocasionam sérios entraves em alface (*Lactuca sativa* L.) e em pimentão (*Capsicum annuum* L.), onde se pode citar o *Lettuce mosaic virus* – LMV e o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), respectivamente. Com o intuito de melhor compreender o reservatório natural de potyvírus em plantas invasoras, amostras foram coletadas em áreas produtoras de pimentão e analisadas utilizando-se antissoro anti-potyvirus (Agdia). Entre estas plantas positivas, destacou-se *Solanum americanum* Mill, onde foi verificada infecção mista do *Cucumber mosaic virus* e do *Potato virus* Y, e *Commelina benghalensis* L. em que foi encontrado um possível novo potyvírus com a maior identidade de nucleotídeos da proteína capsidial (62%) com a espécie *Hardenbergia mosaic virus.* Este potyvírus não foi transmitido por extrato vegetal, bem como por afídeos para plantas de pimentão e *Nicotiana tabaccum* TNN. Na região codificadora para a proteína capsidial do potyvirus não foi encontrado o domínio DAG, relacionado a transmissão por afídeos. Visando encontrar possíveis fontes de resistência ao *Lettuce mosaic virus* - LMV, genótipos foram inoculados com o isolado LMV-AF-199 (LMV-Most) e o fator de iniciação de tradução eucariótico eIF4E destes genótipos analisado. Em Calona e Salinas-88, conhecidas previamente como portadoras dos genes recessivos *mol*^{1} e *mol*^{2} foram observados sintomas em todas as plantas inoculadas e verificado o padrão típico do eIF4E^{1} e eIF4E^{2}, respectivamente. Em Sierra, Robson, Rafaela, Laurel e nos genótipos 169501, 169501C, 172918A, 162499 foi observado o padrão do eIF4E^{0} que corresponde ao alelo de

suscetibilidade em alface. Nos genótipos 169501, 169501C, 172918A e 162499 foi verificado retardo no aparecimento de sintomas e estes inicialmente foram restritos as folhas inoculadas progredindo lentamente às folhas mais velhas. Este fenótipo não pôde ser correlacionado a mutações no alelo eIF4E^0. Apesar dos vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* serem bem estudados, existe pouca informação sobre a localização subcelular de suas proteínas, de modo que esta foi analisada para as proteínas virais VPg, CI e P3N-PIPO do LMV assim como para o fator eucariótico eIF4E de alface. Os ensaios foram realizados *in vivo* em plantas agro infiltradas de *Nicotiana benthamiana*. Em plantas sadias, dois dias após a agroinfiltração das proteínas isoladas, a CI foi observada no citoplasma e núcleo, enquanto que a VPg no núcleo e nucléolo. Na agroinfiltração conjunta de CI+VPg, a sub-localização da VPg foi alterada, tendo sido observada no citoplasma, nucléolo e núcleo. Em plantas infectadas pelo LMV-0 (construção com GFP e mcherry) e agroinfiltradas com CI+VPg, pôde se observar uma forte localização da VPg no citoplasma. Pontuações ao longo da membrana plasmática presumivelmente associadas aos plasmodesmas foram observadas em todos os ensaios em que a CI foi agroinfiltrada, independente da construção P3NPipo/VPg/eIF4e. A agroinfiltração de CI + P3NPipo e CI + eIF4E não causou alterações na localização das duas proteínas, tanto em plantas sadias quanto infectadas por LMV-0. Os ensaios permitiram concluir que a CI, na presença do vírus, é possivelmente direcionado aos plasmodesmas das células vegetais.

Palavras-chave: potyvirus, plantas daninhas, genes recessivos, eIF4E

Potyvirus: PARTIAL CHARACTERIZATION ON WEED SPECIES ASSOCIATED WITH SWEETPEPPER CULTURE, EVALUATION OF LETTUCE GENOTYPES AND SUBCELLULAR ANALYSIS OF eIF4E AND Lettuce mosaic virus PROTEINS. Botucatu, 2013. Thesis (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
Author: MÔNIKA FECURY MOURA
Adviser: RENATE KRAUSE-SAKATE

2. SUMMARY

The *Potyvirus* genus corresponds to 90% of known species of the *Potyviridae* family. In Brazil potyviruses causes serious problems in lettuce (*Lactuca sativa* L) and in pepper crops (*Capsicum annuum* L.), which we can highlight *Lettuce mosaic virus* – LMV and *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), respectively. To increase knowledge about the natural reservoir of potyviruses in weeds, samples were collected from a pepper producer area and analyzed for potyvirus using antiserum anti-potyvirus (Agdia). *Solanum americanum* Mill was identified as a host for *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y*. In *Commelina benghalensis* L. a possible new species of potyvirus was found with higher nucleotide identity of the coat protein (62%) with *Hardenbergia mosaic virus*. This potyvirus could not be transmitted by aphids to sweetpepper and *Nicotiana tabaccum* TNN. The DAG motif, as already demonstrated as important for aphid transmission, was not observed in the coat protein sequence of this potyvirus. Lettuce genotypes were also

evaluated for resistance to *Lettuce mosaic virus* – LMV, isolate LMV-AF-199 (LMV-Most) and the eIF4E allele sequenced. Calona and Salinas-88, previously reported with the *mol*^{1} e *mol*^{2} genes, developed mosaic and necrosis symptoms, respectively. A typical eIF4E^{1} and eIF4E^{2} sequence was observed for these cultivars. For Sierra, Robson, Rafaela, Laurel and genotypes 169501, 169501C, 172918A, 162499, a sequence correlated for eIF4E^{0} was observed, despite the delay in appearance of symptoms observed in 169501, 169501C, 172918A, 162499 genotypes. This phenotype could not be correlated with mutations on the eIF4E^{0} allele. The subcelullar localization of the VPg, CI and P3NPipo of LMV and the eIF4E was analyzed *in vivo* in plants agro-infiltrated of *Nicotiana benthamiana*. In healthy plants, two days after the agroinfiltration of isolated proteins, CI was observed in cytoplasm and nucleus, whereas the VPg on nucleus and nucleolus. When CI+VPg were agro infiltrated simultaneously, the sub-localization of VPg was modified, being observed in cytoplasm, nucleolus and nucleus. In plants infected by LMV-0 (fused with GFP and mcherry) and agroinfiltrated with CI+VPg, the VPg could be observed in the cytoplasm. Points along the plasmatic membrane, presumably associated to the plasmodesmata, were observed in all tests which CI were agroinfiltrated, independently of construction P3NPipo/VPg/elF4e. The agroinfiltration of CI+P3NPipo e CI+elF4E did not caused changes in the co-localization of both proteins either in healthy plants as infected by LMV-0. The tests showed that CI in the presence of the virus is possibly re-located to the plasmodesmata of the cells.

Key-words: potyvirus, weeds, recessive genes, eIF4E

3. INTRODUÇÃO

A família *Potyviridae* constitui a maior e economicamente mais importante família de vírus de plantas, com ampla gama de hospedeiros que englobam dicotiledôneas e monocotiledôneas (HULL, 2002; KING *et al*., 2012).

O gênero *Potyvirus* é o mais estudado entre a família *Potyviridae*, tendo 146 espécies já caracterizadas (KING *et al.*, 2012). São vírus compostos de RNA de fita simples, sentido positivo que ao ser traduzido gera uma poliproteina que se autocliva em 10 proteínas maduras (KING *et al.*, 2012). Recentemente uma pequena ORF incorporada na região codificadora para a proteína P3 foi identificada e denominada de Pretty Interesting Potyviridae ORF - PIPO (CHUNG *et al.*, 2008).

Algumas espécies deste gênero são importantes para culturas agronômicas, podendo ocasionar perdas significativas na produção. O *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e o *Lettuce mosaic virus* (LMV) provocam entraves produtivos nas culturas de pimentão e alface, respectivamente, no Brasil (MOURA, 2009; PAVAN *et al.*, 2008). Em pimentão há também o *Potato virus Y* (PVY), um vírus cosmopolita e de distribuição mundial (JANZAC *et al.*, 2008) mas que no Brasil vem sendo encontrado cada vez com menor freqüência em pimentão (MOURA, 2009). Pouco se sabe sobre a gama de hospedeiros alternativos para os potyvirus em cultivos de pimentão a campo aberto. Neste trabalho foram identificados e caracterizados alguns destes reservatórios, descritos nos capítulos 1 e 2 desta tese.

A resistência genética é a maneira mais eficaz no controle de doenças causadas por vírus. Um exemplo muito conhecido são os genes recessivos *mol*^{1} e *mol*^{2} existentes em alface que conferem tolerância ao *Lettuce mosaic virus* (LMV). O LMV é dividido em dois grupos denominados LMV-Common e LMV-Most. Os LMV-Most são capazes de contornar a resistência conferida pelos genes *mol*^{1} e *mol*^{2} em alface e são transmitidos pela semente nestas cultivares (KRAUSE-SAKATE *et al.*, 2002). Estes isolados já foram descritos em diversas regiões do mundo, incluindo no Brasil (KRAUSE-SAKATE *et al.*, 2002) e infelizmente não há variedades resistentes ou tolerantes para os LMV-Most. O capítulo 3 descreve alguns genótipos avaliados para resistência ao LMV, bem como caracteriza o fator de tradução eucariótico eIF4E destes materiais.

Nos últimos anos estudos vêm tentando elucidar a maneira como ocorre o movimento viral nas células dos hospedeiros. Estes trabalhos foram facilitados devido o desenvolvimento de técnicas que permitem a expressão rápida e fácil de proteínas em plantas através da agroinfiltração, normalmente em *Nicotiana benthamiana*, permitindo a visualização e rastreamento em células individuais através de fusões de proteínas fluorescentes a serem observadas em microscopia confocal. Porém, apesar da grande importância dos potyvirus, o movimento célula a célula viral, a localização das proteínas, bem como da função conjunta das diferentes proteínas virais no ciclo replicativo, ainda necessita ser melhor estudado. Neste trabalho foram estudadas a co-localização das proteínas CI, VPg e P3NPipo do LMV e do eIF4E do alface, no contexto de agroinfiltração em *N. benthamiana* e agroinfiltração desta mesma espécie vegetal previamente infectada com o LMV. Os resultados preliminares estão descritos no capitulo 4 desta tese.

Portanto, o presente trabalho foi dividido em 4 capítulos intitulados:1) "Caracterização de um novo potyvirus encontrado em *Commelina benghalensis* L" redigido em português conforme normas da revista *European Journal of Plant Pathology*; 2) *Solanum americanum*: hospedeira natural do *Potato virus Y* e *Cucumber mosaic virus,* escrito em inglês para a *Summa Phytopathologica*; 3) "Comportamento de genótipos de alface ao LMV e caracterização do alelo eIF4E" redigido em português conforme as normas da revista *Tropical Plant Pathology* e 4) "Estudo da localização subcelular da CI e eIF4E, Vpg e P3NPIPO que contém resultados preliminares obtidos no Institut National de la Recherche Agronomique (INRA – Bordeaux).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Principais características do gênero *Potyvirus*

A família *Potyviridae* possui cerca de 30% dos vírus de plantas já descritos e é umas das famílias mais estudadas entre os fitovírus. Atualmente as espécies podem ser classificadas em sete gêneros *(Potyvirus, Rymovirus, Tritimovirus, Bymovirus, Ipomovirus, Macluravirus* e *Brambyvirus*). Esta divisão é baseada de acordo com o inseto vetor e o número de componentes do genoma viral, que é conservado dentro da família, com exceção do gênero *Bymovirus* que apresenta genoma bipartido (KING *et al*., 2012).

O gênero *Potyvirus*, que inclui os vírus transmitidos por afídeos, representa cerca 1/5 dos fitovirus relatados (HULL, 2002). Possuem partículas alongadas e flexuosas de tamanho entre 680 a 900 nm de comprimento, cerca de 11 a 15 nm de largura e espessura de 3,4 nm. O genoma é constituído por uma molécula de RNA de fita simples, em torno de 10.080 nucleotídeos, senso positivo, apresentando uma única fase aberta de leitura (open reading frame, ORF) localizada entre as regiões 5'NTR e 3'NTR. O genoma é composto por uma poliproteína, que após processos de clivagem geram 10 proteínas maduras e uma proteína incorporada na região codificadora para a proteína P3, denominada PIPO (CHUNG *et al.*, 2008; KING *et al*., 2012). Esta ORF é traduzida na fase +2 e sua expressão ocorre pela fusão da proteína P3 na região N-terminal (P3N-PIPO) como pode ser observado na Figura 1. A extremidade 5' do genoma dos potyvirus é covalentemente ligada a uma proteína de origem viral, denominada de VPg, e o terminal 3' é poliadenilado (MURPHY *et al.*, 1991; ADAMS *et al.*, 2005) (Figura 1). A proteína CI forma inclusões cilíndricas denominadas "cata-vento", que é uma característica taxonômica importante de espécies classificadas à família *Potyviridae* (MURPHY *et al*., 1991). Já a proteína Nib (Nuclear inclusion b), forma inclusões nucleares, assim como a proteína NIa (Nuclear inclusion a - VPg-Pro) (URCUQUI-INCHIMA *et al*, 2001).

Figura 1 - Esquema do genoma dos potyvirus representando as proteínas geradas após clivagem da poliproteína, bem como das proteínas PIPO e P3N-PIPO. As numerações indicam o primeiro e último nucleotídeo da ORF completa do *Turnip mosaic virus* (Adaptado de WEI *et al*., 2010).

A poliproteína dos potyvirus é processada através de três proteases codificadas pelos vírus que são denominadas de P1, HC-Pro e NIa. As duas primeiras proteases autoclivam-se em *cis*. A última atua de duas maneiras: na própria clivagem em *cis* e em seis clivagens em *trans* (DAROS & CARRINGTON, 1997; URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001). As proteínas geradas através destes processos são multifuncionais e produzidas em quantidades exatamente iguais. Porém, esta produção não é dependente da quantidade necessária requisitada pelo vírus, isto é, a produção de determinada proteína pode ser gerada em excesso podendo ocasionar acúmulos nas células infectadas. Todas essas características são inerentes ao mecanismo de replicação dos potyvírus (SHUKLA *et al.*, 1994; URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2001).

A proteína capsidial dos potyvirus contém três regiões distintas, sendo uma região variável em tamanho e seqüência, localizada na extremidade amino-terminal; a região central com cerca de 215 a 227 aminoácidos altamente conservada e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos (SHUKLA *et al.*, 1991). O motivo conservado DAG (Asp-Ala-Gly), relacionado à transmissão por afídeos, é muito estudado e encontra-se na

região N-terminal da proteína capsidial (ATREYA *et al.*, 1995). Esta proteína também é uma das mais importantes para a taxonomia dos potyvírus. Os critérios para estabelecimento de uma nova espécie no gênero incluem a análise da identidade de seqüência de aminoácidos da capa protéica inferior a 80%; identidade da seqüência de nucleotídeos menor que 76% na seqüência completa da proteína capsidial ou em relação ao genoma viral; presença de diferentes sítios de clivagem na poliproteína; análise da gama de hospedeiros e o modo de transmissão (KING *et al.*, 2012). A proteína HC-Pro, possui dois motivos conservados relacionados à transmissão por insetos vetores. O motivo PTK interage com o motivo DAG, que está presente na CP, e o motivo KITC tem afinidade pela cutícula do estilete dos afídeos (PIRONE & BLANC, 1996).

O movimento viral nas plantas pode ocorrer de duas formas: movimento célula-a-célula e movimento sistêmico (GILBERTSON & LUCAS, 1996). O movimento célula-a-célula através das conexões intercelulares denominadas de plasmodesmas, envolve pelo menos as proteínas HC-Pro, CP, CI e Vpg no caso dos potyvirus (CARRINGTON *et al.*, 1996; HULL, 2002). A proteína recém identificada denominada PIPO, também está relacionada ao movimento viral. Wen & Hajimorad (2010) verificaram que adicionando um ou mais códons de parada na proteína PIPO do *Soybean mosaic virus* (SMV), sem substituição de aminoácidos na poliproteina, a replicação viral não foi alterada, porém observou-se uma restrição viral do mutante nas células das folhas inoculadas, indicando envolvimento no movimento célula-a-célula. Wei et al (2010), demonstraram que a P3N-PIPO é uma proteína co-localizada nos plasmodesmas e que há uma interação física entre a P3N-PIPO e a CI, onde a P3N-PIPO atuaria direcionando a CI para os plasmodesmas. O movimento sistêmico baseia-se na capacidade do vírus de entrar e sair dos elementos do tubo crivado, floema e células companheiras, utilizando também os plasmodesmas que fornecem a conectividade entre as células. As proteínas relacionadas no movimento a longa distância dos potyvirus descritas até o momento são a HC-Pro e a proteína capsidial (CRONIN *et al.*, 1995; CARRINGTON *et al.*, 1996).

4.2 O fator de tradução eucariótico 4E e a resistência aos potyvirus

Os vírus são parasitas obrigatórios, portanto, dependentes da maquinaria celular do hospedeiro para que a infecção seja eficiente. A perda ou mutação de um fator da planta essencial para o vírus completar o seu ciclo pode induzir a uma resistência recessiva aos

vírus (DIAZ-PENDON *et al*., 2004). Até o momento, todos os genes recessivos envolvidos na interação planta-vírus foram caracterizados como codificadores do fator de iniciação de tradução eucariótico (eIFs), dentre estes o eIF4E, eIF4G e isoformas. Ao contrário do verificado em eucariotos, as plantas possuem uma segunda forma do eIF4F denominada de isoforma ou eIF(iso)4F. Todos esses fatores podem ter atividades complementares e/ou redundantes (WANG & KRISHNASWAMY, 2012).

Até o momento foram caracterizados 14 genes de resistência recessivos naturais contra vírus de plantas. Estes foram clonados a partir de diferentes espécies vegetais dos quais pode-se citar o *mo1* em alface (*Lactuca sativa*) (NICAISE *et al.*, 2003); *nsv* em melão (*Cucumis melo*) (NIETO et al 2006); *pot-1* em tomate (*Solanum lycopersicum*) (RUFFEL *et al.*, 2005); os genes *rym4*, *rym5* e *rym6* em cevada (*Hordeum vulgare*) (KANYUKA *et al.*, 2005; STEIN *et al.*, 2005); os genes *sbm1*, *wlv* e *cyv2* em ervilha (*Pisum sativum*) (GAO *et al.*, 2004). Todos esses genes codificam o fator de tradução eucariótico 4E (eIF4E) ou a sua isoforma eIF(iso)4E. Os genes *tsv1* e *rymv-1* em arroz (*Oryza sativa*), codificam uma forma mutada do eIF4G ou uma forma do eIF(iso)4G, conferindo resistência aos virus *Rice tungro spherical virus* (RTSV, *Waikavirus*) (LEE *et al.*, 2010) e *Rice yellow mottle virus* (RYMV, *Sobemovirus*) (ALBAR *et al.*, 2006). Os primeiros genes recessivos caracterizados como codificadores do fator de tradução eucariótico foram *pvr2* e *pvr6*, correspondentes ao eIF4E e eIF(ISO)4E e provenientes de pimenta e pimentão (*Capsicum annuum* and *C. chinense*), respectivamente (RUFFEL *et al.*, 2002; RUFFEL *et al.*, 2006).

A tradução inicial é um processo de múltiplos passos que requer a montagem de um complexo proteína-mRNA por eIFs diferentes. A primeira etapa é a ligação do eIF4E à 5'-7mGpppN capeada (CAP) dos mRNAs. Subsequentemente o eIF4E recruta o eIF4G e eIF4A, formando o complexo eIF4F (GOODFELLOW & ROBERTS, 2008). No caso dos potyvirus a proteína VPg encontra-se ligada à região 5'do genoma, atuando no papel do CAP (NIEPEL & GALLIE, 1999). Entre as funções da VPg destaca-se o recrutamento de fatores importantes para tradução pelos ribossomos. A proteína VPg tem sido identificada como um determinante de virulência dos potyvirus para contornar a resistência recessiva mediada pelo eIF4E, demonstrando existir uma interação entre a proteína viral e este fator de iniciação de tradução eucarioto (KANG et al, 2005; CHARRON *et al.*, 2008; ROUDET-TAVERT *et al.*, 2012).

Existem hoje pelo menos três mecanismos propostos para interação do eIF4E durante a infecção por potyvirus (WANG & KRISHNASWAMY, 2012). São elas: a) ligação do eIF4E à VPg viral e recrutamento do complexo de tradução essencial para tradução do genoma viral dos potyvirus; b) eIF4E, CI e eIF4G podem formar um complexo que se liga a VPg para mediar o trafego intracelular do genoma viral pelos plasmodesmas (movimento célula-a-célula) e movimento sistêmico, e c) o complexo VPg-eIF4E pode estar envolvido na supressão do transporte mediado pelo eIF4E do mRNA do núcleo ao citoplasma para tradução e no distúrbio do processamento dos siRNA e microRNA no núcleo. eIF4E, P1, VPg e HC-Pro poderiam formar um complexo que funcionaria como um supressor do silenciamento de RNA para garantir a tradução/replicação do vírus no citoplasma. Os três mecanismos estão exemplificados na Figura 2 retirada de Wang & Krishnaswamy (2012).

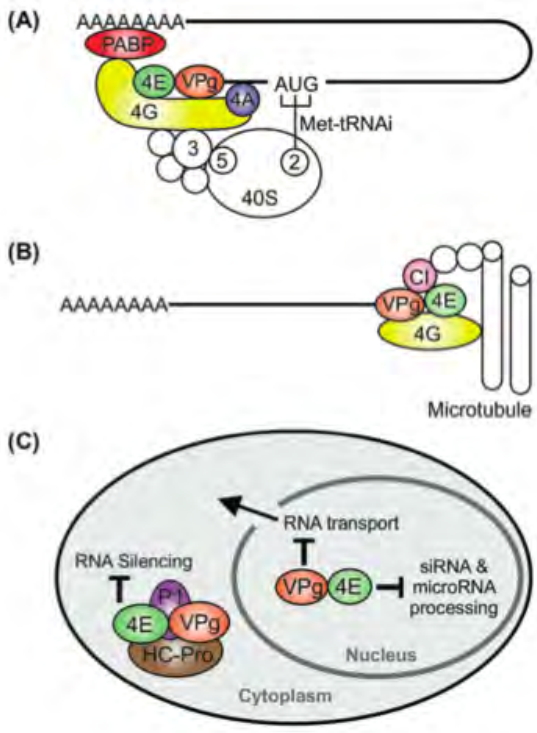

Figura 2 - Presumíveis modelos de interação do fator de tradução eucarióticos 4E (eIF4E) durante a infecção por potyvirus, (a) eIF4E liga-se a VPg para a tradução dos potyvirus, (b) complexo formado pelo eIF4E, CI e eIF4G liga-se a VPg para mediar o movimento do genoma viral, (c) o complexo formado pelo eIF4E e VPg pode estar envolvido no

impedimento do transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma (WANG & KRISHNASWAMY, 2012).

4.3 A resistência da alface ao LMV

Em alface a resistência ao LMV é conferida pelos alelos recessivos *mo1*^{1} e *mo1*^{2} considerados alelos mutantes de um único gene chamado de *mo1* e codificado pelo eIF4E (NICASE *et al*., 2003; GERMAN-RETANA *et al.*, 2008). O alelo *mo1*^{1} foi inicialmente denominado de "gg" e identificado na Argentina na cultivar Gallega de Invierno por Von der Pahlen & Crnko (1965). O alelo *mo1*^{2} foi isolado de *Lactuca serriola* proveniente do Egito, PI-251245 Ryder (1970).

Com base no fenótipo das cultivares de alface frente aos isolados do LMV, Pink *et al.* (1992) propuseram uma classificação dos isolados em patótipos, onde o patótipo I infectam apenas cultivares que não possuem genes de resistência. O patótipo II é capaz de infectar as cultivares que possuem o gene *Mo2,* mas não aquelas com os genes *mol*^{1} (gg) e *mol*^{2} (momo). Isolados pertencentes ao patótipo III superam a resistência proporcionada pelos genes *Mo2* e *mol*^{1}. Os isolados pertencentes ao patótipo IV são capazes de superar a resistência proporcionada pelos três genes.

No Brasil, Stangarlin (1995) observou em cultivares comercias no Estado de São Paulo, consideradas tolerantes ao LMV, sintomas da infecção pelo vírus, identificando o patótipo IV no país. Além do IV, já foram identificados, em alface, o patótipo II (STANGARLIN, 2000) e o patótipo III (COSSA *et al.,* 2000).

De acordo Krause-Sakate *et al.* (2002) os isolados do LMV podem ser agrupados em três grandes grupos: um grupo do Yemen, um de Balkans (Grécia e Croácia) denominado grupo Gr e o grupo RoW (Rest of the World). Os isolados dos grupos Yemen e Gr, não são transmitidos por sementes, infectando plantas portadoras dos alelos *mo1*^{1} e *mo1*^{2}. O grupo RoW é dividido em dois sub-grupos: o LMV-Commom, onde os isolados são incapazes de infectar plantas com os alelos *mo1*^{1} ou *mo1*^{2} e o LMV-Most (*mo1*-breaking seed transmitted) que superam a tolerância conferida por ambos os alelos e são transmitidos via sementes.

Na Tabela 1 podem ser visualizadas as principais mutações capazes de discriminar os alelos *mo1* em alface. No caso do alelo eIF4E^{1} uma deleção de seis nucleotídeos ocorre entre as posições 344 a 349 (NICAISE *et al*., 2003). Dependendo da agressividade do

isolado de LMV, o alelo *mo1* confere resistência verdadeira ou também conhecida como imunidade (ausência de acumulação viral nas plantas inoculadas) ou tolerância, onde há acumulação viral, porém a planta não apresenta sintomas ocasionados pela infecção viral (GERMAN-RETANA *et al.*, 2008).

A VPg do LMV interage *in vitro* com o eIF4E de alface (MICHON *et al*., 2006; ROUDET-TAVERT *et al.*, 2007). Porém duas regiões genômicas independentemente são responsáveis pela "quebra" de resistência de alguns isolados de LMV em alfaces portadoras do gene *mo1*: a VPg possibilita contornar o alelo $mo1^1$, enquanto que o terminal da CI (CI-Cter) possibilita contornar $mo1^1$ e $mo1^2$ (ABDUL-RAZZAK *et al*., 2009). Isto foi demonstrado para os isolados LMV-0 e LMV-E, onde o primeiro isolado não infecta sistemicamente genótipos de alface portadoras do alelo $mo1^1$ enquanto que o LMV-E infecta sistemicamente e causa sintomas em alfaces portadoras dos alelos $mo1^1$ e $mo1^2$. A substituição da VPg do LMV-0 pela do LMV-E confere ao vírus recombinante a habilidade de contornar a resistência mediada pelo alelo $mo1^1$ enquanto que a CI do LMV-E possibilita o LMV-E contornar ambos alelos $mo1^1$ e $mo1^2$ (ABDUL-RAZZAK *et al*., 2009).

Roudet-Tavert *et al.* (2012) verificaram que o terminal da CI (CI-Cter) e a VPg do LMV, bem como o eIF4E de alface interagem *in vitro* e *in vivo* e que esta interação é mais forte para o isolado LMV-E quando comparada com o LMV-0. A proteína CI é necessária para a replicação do RNA viral, possui atividade de helicase e ATPase e já foi demonstrada como essencial ao movimento intra e inter celular (CARRINGTON *et al*., 1998; WEI *et al*., 2010). Deste modo para o LMV é possível que a resistência mediada pelo eIF4E esteja associada com a dificuldade do vírus infectar sistemicamente a planta, ou de se mover célula a célula pela interação da VPg, CI, eIF4E e eIF4G, conforme exemplificado pela Figura 2b (WANG & KRISHNASWAMY, 2012).

	Posição dos nucleotídeos				
Alelos	228	299	344-349	576	730
mol^{0}/eIF4E^{0}	G	C	AAGAGC	G	C/T
mol^{1}/eIF4E^{1}	-	T	Deleção	T	-
mol^{2}/eIF4E^{2}	C	-	-	-	T

Tabela 1 – Diferenças entre a seqüência de nucleotídeos verificada nos três alelos eIF4E descritos em alface. O número indica a posição dos nucleotídeos na sequência eIF4E. Adaptado de Nicaise *et al*. (2003).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RAZZAK, A., GUIRAUD, T., PEYPELUT, M., WALTER, J., HOUVENAGHEL, M. C., CANDRESSE, T., Le GALL, O. & GERMAN-RETANA, S. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against lettuce mosaic potyvirus. Mol Plant Pathol, v.10, p.109–113, 2009.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. Archieves of Virology, v.150, p.459-479, 2005.

ALBAR, L., BANGRATZ-REYSER, M., HÉBRARD, E., NDJIONDJOP, M.N., JONES, M., GHESQUIÉRE, A. Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. Plant J. v.47, p.417–426, 2006.

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

CARRINGTON, J.C., KASSCHAU, K.D., MAHAJAN, K.S., SCHAAD, M.C. Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. The Plant Cell, v.8, p.1669-1681, 1996.

CARRINGTON, J.C., JENSEN, P.E., SCHAAD, M.C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. Plant J. v.14, 393–400, 1998.

CHARRON, C., NICOLAL, M., GALLOIS, J.L., ROBAGLIA, C., MOURY, B., PALLOIX, A., CARANTA, C. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. Plant J. 54, 56 – 68, 2008.

CHUNG, B. Y.-W., MILLER, A.W., ATKINS, J.F., FIRTH, A.E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. PNAS, v.105, n.15, p. 5897–5902, 2008.

COSSA, A.C.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; Partial characterization of Lettuce mosaic virus (LMV). Pathotype III in hydroponic lettuce. Virus Reviews & Research, v. 5, n. 2, p.195, 2000.

CRONIN, S., VERCHOT, J., HALDEMAN-CAHILL, R., SCHAAD, M.C., CARRINGTON, J.C. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. Plant Cell, v.7, n.5, p.549–559, 1995.

DAROS, J.A., CARRINGTON, J.C. RNA binding activity of Nia proteinase of Tobacco etch potyvirus. Virology, v.237, p.327-336, 1997.

DIAZ-PENDON, J.A., TRUNIGER, V., NIETO, C., GARCIA-MAS, J., BENDAHMANE, A., ARANDA, M.A. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. Mol. Plant Pathol. v.5, 223–233, 2004.

GAO, Z.H., JOHANSEN, E., EYERS, S., THOMAS, C.L., ELLIS, N., MAULE, A.J. The Potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. Plant J. v.40, p376–385, 2004.

GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J.; LEGALL, O. Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. Molecular Plant Pathology, v.9, p.127-136, 2008.

GILBERTSON, R. L., LUCAS, W. J. How do viruses traffic on the ‘vascular highway’? Trends in Plant Science, v.1, n.8, p.250–251, 1996.

GOODFELLOW, I.G., ROBERTS, L.O. Eukaryotic initiation factor 4E. Int. J. Biochem. Cell Biol. v.40, p.2675–2680, 2008.

HULL, R. Matthews Plant Virology. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1001p. 2002.

JANZAC, B. FABRE, M-F, PALLOIX, A., MOURY, B. Mechanism and spectrum of action of the pvr4 resistance in pepper against potyviruses and selection of virulents variants. Plant. Pathol., 2008.

KANG B.C., YEAM, I., FRANTZ, J.D., MURPHY, J.F., JAHN, M.M. The pvr1 locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. Plant J. 42, 392– 405, 2005.

KANYUKA, K., DRUKA, A., CALDWELL, D.G., TYMON, A., McCALLUM, N., WAUGH, R., ADAMS, M.J. Evidence that the recessive bymovirus resistance locus rym4 in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. Mol. Plant Pathol. v.6, p.449–458, 2005.

KING, A.M.Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, J.M., CARSTENS, E.B. Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1327p, 2012.

KRAUSE-SAKATE, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Pavan, M.A., Souche, S., Lot, H., Zerbini, F.M., Candresse, T.. Molecular characterization of Lettuce mosaic virus field isolated reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. Phytopathology, v.92, p.563-572, 2002.

LEE J.-H., MUHSIN, M., ATIENZA, G.A., KWAK, D.-Y., KIM, S.-M., De LEON, T.B., ANGELES, E.R., COLOQUIO, E., KONDOH, H., SATOH, K., CABUNAGAN, R.C., CABAUATAN, P.Q., KIKUSHI, S., LEUNG, H., CHOI, I.-R. Single nucleotide polymor-phisms in a gene for translation initiation factor (eIF4G) of rice (Oryza sativa) associated with resistance to Rice tungro spherical virus. Mol. Plant–Microbe Interaction, v.23, p.29–38, 2010.

MICHON, T., ESTEVEZ, Y., WALTER, J., GERMAN-RETANA, S., Le GALL, O. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryo- tic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. FEBS J. v.273, p.1312–1322, 2006.

MOURA, M.F. Variabilidade de Potyvirus infectando Capsicum spp. no Estado de São Paulo. 2009, 89p. (Dissertação de Mestrado) - Curso de Agronomia (Proteção de Plantas), UNESP – Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu, Botucatu.

MURPHY, S.F. et al. A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottiling virus links the VPg to the viral RNA. Journal of Virology, v. 65, p.511-513, 1991.

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

NIEPEL, M., GALLIE, D.R. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. Journal of Virology, v.73, n.11, p.9080-9088, 1999.

NIETO, C., MORALES, M., ORJEDA, G., CLEPET, C., MONFORT, A., STURBOIS, B., PUIG-DOMENECH, P., PITRAT, M., CABOCHE, M., DOGIMONT, C., GARCIA-MAS, J., ARANDA, M.A., BENDAHMANE, A. An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. Plant J. v.48, p.452–462, 2006.

PAHLEN Von Der A., CRNKO J. El virus de la mosaico de la lechuga (*Marmor lactucae* Holmes) en Mendoza y Buenos Aires. Revista de Investigaciones Agropecuarias, p.25-31, 1965.

PAVAN, M.A., KRAUSE-SAKATE, R., SILVA, N., ZERBINI, F.M., LE GALL, O. Virus Diseases of Lettuce in Brazil, Plant Viruses, n.2, v.1, p.35-41, 2008.

PINK, D.A.C.; KOSTAOVA, D.; WALKEY, D.G.A. Differentiation of strains of lettuce mosaic virus. Plant Pathology, v.41, p.5-12, 1992.

PIRONE, T.P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Annual Review Phythopatology, v.34, p.227-247, 1996.

ROUDET-TAVERT, G., MICHON, T., WALTER, J., DELAUNAY, T., REDONDO, E., Le GALL, O. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HC-Pro. J. Gen. Virol. v.88, p.1029–1033, 2007.

ROUDET-TAVERT, G.; ABDUL-RAZZAK, A.; DOUBLET, B.; WALTER, J.; DELAUNAY, T.; GERMAN-RETANA, S.; MICHON, T.; Le GALL, O.; CANDRESSE, T. The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. Journal of General Virology, v. 93, p.184–193, 2012.

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

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

RUFFEL, S., GALLOIS, J.L., MOURY, B., ROBAGLIA, C., PALLOIX, A. and CARANTA, C. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. J. Gen. Virol., v.87, p.2089–2098, 2006.

RYDER, E.J. Inheritance of resistance to common lettuce mosaic. Journal of the American Society for Hrticultural Science., v.95, p.378-379, 1970.

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

SHUKLA, D.D. ; WARD, C.W. ; BRUNT, A.A. The Potyviridae. Cab.International Oxford, 516p., 1994.

STANGARLIN, O., PAVAN, M.A., SILVA, N. Ocurrence of a new pathotype of *lettuce mosaic virus* on lettuce in Brasil. Plant Disease, St. Paul, v. 84, n.4, p.490, 2000.

STANGARLIN, O. S. Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (Lactuca sativa L.) resistentes ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo. 1995. 72 f. Dissertação (Mestrado em e Proteção de Plantas) UNESP-FCA Faculdade de Ciências Agronômicas Botucatu, 1995.

STEIN, N., PEROVIC, D., KUMLEHN, J., PELLIO, B., STRACKE, S., STRENG, S., ORDON, F., GRANER, A. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in Hordeum vulgare (L.). Plant J. v.42, p.912–922, 2005.

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

WANG, A.; KRISHNASWAMY, S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, v.13, n.7, p.795-803, 2012.

WEI, T., ZHANG, C., HONG, J., XIONG, R., KASSCHAU, K.D., ZHOU, X., CARRINGTON, J.C., WANG, A. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. PLoS Pathogens, v.6, n.6, 2010.

WEN, R.H., HAJIMORAD, M.R. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. Virology, v.400, 1–7, 2010.

CAPÍTULO 1

Título: Caracterização parcial de um potyvirus infectando Trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) no Brasil. Parcial Characterization of a Potyvirus infecting Benghal dayflower (*Commelina benghalensis* L.) in Brazil.

Redigido conforme as normas da revista European Journal of Phytopathology

Caracterização parcial de um potyvirus infectando trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) no Brasil. Parcial characterization of a potyvirus infecting benghal dayflower (*Commelina benghalensis* L.) in Brazil.

*Mônika Fecury Moura, *José Marcelo Soman, *Julio Massaharu Marubayashi, **Valdir A Yuki, *Marcelo Agenor Pavan, *Renate Krause-Sakate.

*UNESP-FCA (Botucatu), Rua José Barbosa de Barros, 1780, Departamento de Proteção Vegetal – Laboratório de Virologia Vegetal.

**Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Av. Barão de Itapura, 1481 - Campinas

Autor para correspondência: Mônika Fecury Moura (mfecurym@fca.unesp.br)

RESUMO

Trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) é uma planta daninha facilmente encontrada em áreas cultivadas por solanaceas e frequentemente está infectada pelo *Cucumber mosaic virus* (CMV) no Brasil. Neste trabalho plantas desta espécie, apresentando sintomas de mosaico, foram coletadas em Lins (SP) em 2011, em campos comerciais de pimentão e analisadas para presença de vírus. Nas 17 plantas analisadas foi verificada a presença do CMV e detectado um potyvirus pelo teste de ELISA utilizando-se antissoro anti-potyvirus. A microscopia eletrônica confirmou a presença de partículas alongadas e flexuosas medindo cerca de 800 nm, típica dos potyvirus. O sequenciamento da proteína capsidial indicou maior identidade de nucleotídeos (62%) com a espécie *Hardenbergia mosaic virus*. O potyvirus não foi transmitido por extrato vegetal para as espécies de hospedeiras testadas, bem como também não foi transmitido por afídeos da espécie *Myzus persicae* para pimentão (*Capsicum annuum* cv. Magda) e *Nicotiana tabaccum* "TNN". A sequência de aminoácidos "DAG", localizado na região N-terminal da CP, relacionado com a transmissão dos potyvirus por afídeos, não foi encontrado na CP deste potyvirus. A ausência do motivo DAG pode estar relacionada a não transmissão do potyvirus pelo vetor *Myzus persicae*. A importância deste potyvirus é totalmente desconhecida. O nome provisoriamente sugerido para a espécie é Commelina mottle virus (CoMoV).

Palavras-chave: planta daninha, potyvirus, pimentão

ABSTRACT

Benghal dayflower (*Commelina benghalensis* L.) is a weed easily found in solanaceous cultivated areas in Brazil and being often infected with *Cucumber mosaic virus* (CMV). During 2011, plants of this species showing mosaic symptoms were collected in Lins (SP) in sweetpeppers commercial fields and analyzed for the presence of viruses. In 17 plants analyzed, the presence of CMV and potyvirus was confirmed by RT-PCR and ELISA assay using anti-potyvirus antiserum. Electron microscopy confirmed the presence of elongated and flexuous particles measuring about 800 nm, typical of potyvirus. The higher nucleotide identity observed for the capsid protein was of 62% with *Hardenbergia mosaic virus*. The potyvirus was not sap transmitted and not transmitted by the aphids *Myzus persicae* to sweetpepper (*Capsicum annuum* cv. Magda) and *Nicotiana tabaccum* "TNN". The triplet aminoacid "DAG", related to the transmission of potyviruses by aphids, was not found in the N-terminal region of the viral CP from this potyvirus. The absence of DAG may be related to the untransmissibility of this potyvirus by aphids. The economical importance of this potyvirus is totally unknown. The suggested name for the species is Commelina mottle virus (CoMoV).

Key-words: Weeds, potyvirus, sweetpeppers

INTRODUÇÃO

A trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) é uma planta daninha da classe Monocotiledonea, família Commelinaceae (LORENZI, 1994). É uma das três espécies mais importantes nesta família cuja reprodução se dá principalmente por sementes (LORENZI, 1994).

Estima-se que no Brasil a perda produtiva devido a interferência de plantas daninhas seja em torno de 20 a 30%. Este entrave pode ser maior quando estas plantas atuam como fonte de inóculo, comprometendo indiretamente algumas culturas agrícolas (LORENZI, 1994). No mundo, entre as espécies virais que podem ser encontradas infectando plantas do gênero Commelina encontra-se: *Commelina mosaic virus* (CoMV-Potyvirus) e *Commelina yellow mottle virus* (ComYMV-Badnavirus). Essas espécies são restritas ao gênero Commelina (MORALES & ZETTLER, 1977; MIGLIORI & LASTRA, 1978). No Brasil, o vírus mais comum observado em trapoeraba é o *Cucumber mosaic virus* (CMV – Cucumovirus) (DUARTE *et al*., 1994). Recentemente, também foi detectado naturalmente *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C - *Cilevirus*) em pomares cítricos (NUNES *et al*., 2012).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso com cerca de 146 espécies descritas e que inclui os vírus de RNA senso positivo, com um componente genômico, que são transmitidos por afídeos (ANDREW *et al.*, 2012). Entre os critérios de demarcação de novas espécies dentro do gênero incluem-se a identidade de aminoácidos da proteína capsidial (CP) menor que 80% e a identidade de nucleotídeos na CP ou em todo o genoma menor que 76% (ANDREW *et al.*, 2012).

Em 2011, o total de 17 plantas sintomáticas de trapoeraba foram coletadas na Região de Lins no estado de São Paulo (Figura 1a). Os sintomas observados variaram de mosqueado a mosaico. Para verificar a possível presença de potyvirus as amostras foram analisadas através do teste de ELISA indireto utilizando-se o antissoro policlonal universal anti-potyvirus (Agdia) na proporção 1:100, seguindo as recomendações do fabricante. A revelação foi feita usando-se o p-nitrofenilfosfato (pastilha de 5 mg) diluída em 5 mL de tampão específico. As amostras foram consideradas positivas quando o valor de absorbância (A405) foi de pelo menos três vezes do obtido para as plantas sadias. Todas as plantas analisadas foram positivas para potyvirus neste teste.

As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão por leaf dip e partículas alongadas e flexuosas com cerca de 800 nm de comprimento, característicos do gênero *Potyvirus* foram encontradas (Figura 1b).

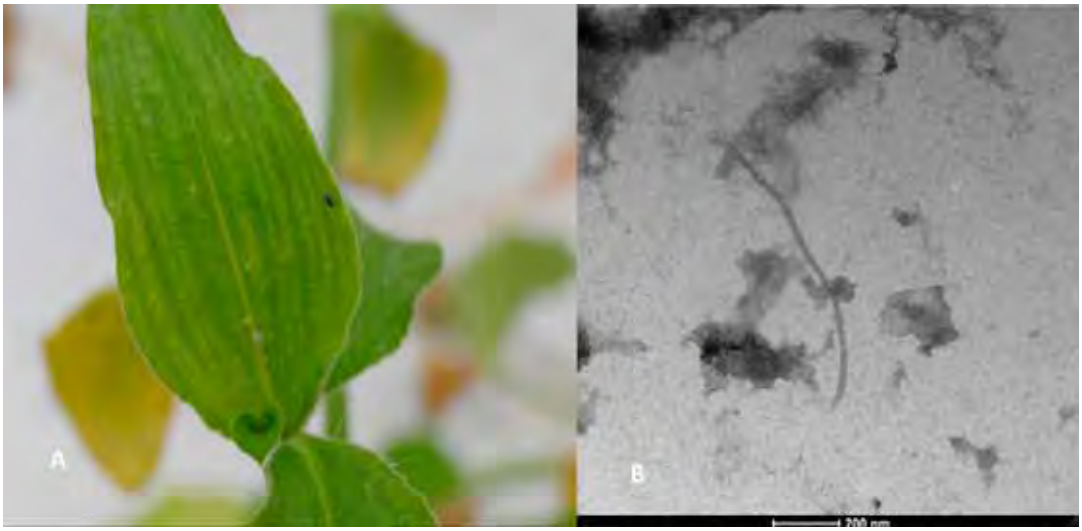

Figura 1 – Planta de trapoeraba (*Commelina benghalensis*) infectada com *Cucumber mosaic virus* e potyvirus (a); partícula viral observada no isolado 39d em microscopia eletrônica de transmissão (b).

As 17 plantas também foram testadas para presença de CMV, utilizando-se o teste RT-PCR com os oligonucleotídeos 038-8 e 035-3, conforme descrito por BOARI et al, (2000). Todas as amostras foram positivas para presença de CMV.

Folhas de cinco plantas de trapoeraba positivas para presença de CMV e potyvirus foram utilizadas no ensaio de transmissão por extrato vegetal. Os inóculos foram preparados a partir da maceração das folhas em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0, adicionou-se a solução abrasiva Carborundum de 400 mesh e o produto macerado foi friccionado nas folhas de plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo* cv. Caserta), *Nicotiana tabaccum* "TNN", *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale*, pimentão (*Capsicum annuum* cv. Magda) e tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara). As plantas foram mantidas em casa de vegetação para a observação de sintomas aos 10, 14 e 20 dias após a inoculação. Em Caserta, TNN e *N. benthamiana* foram verificados sintomas de mosaico, enquanto em pimentão e tomateiro mosqueado. Todas as plantas inoculadas foram negativas por ELISA anti-potyvirus e positivas para CMV por RT-PCR (Tabela 1).

Planta Hospedeira	Sintomas	RT-PCR Potyvirus	RT-PCR CMV
Abobrinha (*Cucurbita pepo* cv. Caserta)	Mosaico	Negativo	Positivo
Nicotiana tabaccum "TNN"	Mosaico	Negativo	Positivo
Nicotiana benthamiana	Mosaico	Negativo	Positivo
Chenopodium quinoa	Lesão local	Negativo	Positivo
C. amaranthicolor	Lesão local	Negativo	Positivo
Pimentão (*Capsicum annuum* cv. "Magda")	Mosqueado	Negativo	Positivo
Tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. "Santa Clara")	Mosqueado	Negativo	Positivo

Tabela 1 - Sintomatologia observada nas hospedeiras inoculadas com os isolados de potyvirus 32d e 39d coletados de campo.

Testou-se a transmissão do potyvirus por afídeos da espécie *Myzus persicae* (Sulzer). Estes permaneceram em jejum por 30 minutos antes da transmissão. Com o auxílio de um pincel, os afídeos foram transferidos para folhas de trapoeraba, isolado 39d infectadas por potyvirus + CMV, onde permaneceram durante uma hora para adquirir o vírus, seguido de transferência para folhas de pimentão (*Capsicum annuum* var. Magda) e *Nicotiana tabaccum* "TNN" onde permaneceram por 2 horas. Foram inoculadas três plantas de cada uma das duas espécies vegetais utilizando-se 5 pulgões por planta. Os sintomas foram avaliados aos 15 dias após a transmissão e verificou-se mosqueado em pimentão e em fumo. O RNA total das plantas dos testes de gama de hospedeiro e transmissão por afídeo foram extraídas pelo método descrito por Bertheau *et al.* (1998), onde foram posteriormente analisadas por RT-PCR utilizando o par de oligonucleotídeos PV-1 (5' GAT TTA GGT GAC ACT ATA GTT TTT TTT TTT TTT TTT 3') e WCIEN (5' ATG GTT TGG TGY GAR ATT 3') descritos por Gibbs & Mackenzie (1997) e por Pappu *et al.* (1993), respectivamente, para detecção de potyvirus.

Somente o CMV foi transmitido pelos afídeos para pimentão e *N. tabaccum* "TNN". Em nenhuma planta foi detectada a presença de potyvirus, indicando a não transmissão do potyvirus por *M. persicae* para as espécies testadas.

Os mesmos cinco isolados utilizados na caracterização biológica foram selecionados para sequenciamento de regiões do genoma viral visando caracterizar molecularmente a espécie de potyvirus. O RNA foi extraído pelo Kit de extração Total RNA Purification da

marca Norgen de acordo com o protocolo do fabricante. Utilizou-se uma alíquota de 5 μL para a RT-PCR com os oligonucleotideos PV-1/WCIEN, CIFor/CIRev (Ha *et al*., 2008), NIb2F/NIb3R (Zheng *et al*., 2010), que amplificam parcialmente as proteínas CP, CI e NIb, respectivamente. Além disso foi sintetizado um oligonucleotideo baseado em regiões conservadas na porção N-terminal da CP (CP rev173 5' GAATTC GTC CAT ATC GTG GC 3') utilizado com PV1 para amplificação da CP completa. A reação de RT-PCR foi realizada em uma só etapa para obter a amplificação das proteínas CI e NIb dos potyvirus, assim como parte da região da proteína capsidial. Para as reações utilizou-se o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega), seguindo as especificações do fabricante para o volume final de 50 μL.

A CP completa foi obtida através de RT-PCR em duas etapas. A reação de RT foi realizada para um volume final de 25 μL utilizando-se 1,0 μL da enzima AMV (Avian mieloblastosis virus) Reverse Transcriptase (Promega), 1 μL de dNTPs (25 μM), 0,5 μL do oligonucleotídeo à 100 μM e 5 μL de RNA total extraído pelos métodos descritos anteriormente. A reação de RT foi realizada de acordo com procedimentos descritos no catálogo para a enzima AMV e a reação de PCR foi realizada utilizando o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega), seguindo as especificações do fabricante.

Os fragmentos virais amplificados pelos oligonucleotídeos testados foram sequenciados utilizando-se diretamente o produto de PCR purificado pelo Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). As sequências obtidas através dos produtos do sequenciamento foram analisadas pelo programa CLUSTAL Interative W (THOMPSON *et al.*, 1994). A construção das árvores filogenéticas foram realizadas pelo programa MEGA, versão 5 (TAMURA *et al.*, 2011).

A sequencia completa da proteína capsidial do potyvirus detectado em trapoeraba no Brasil, apresentou de 31% a 38% de identidade de aminoácidos com o *Chilli veinal mottle virus* – ChiVMV (Acesso GenBank: AJ237843) e *Potato virus A* - PVA (Acesso GenBank: Z21670). Já a identidade de nucleotídeos nesta mesma região variou entre 58% com Chilli veinal mottle virus (Acesso GenBank: AJ 237843) e PepYMV (Acesso GenBank: HQ 594522) e 62% com *Hardenbergia mosaic virus* - HarMV (Acesso GenBank: JF 427597). Para que potyvirus sejam considerados da mesma espécie a identidade de aminoácidos e nucleotídeos na região codificadora para a proteína capsidial (CP) precisa ser superior a 80% e 76%, respectivamente (ANDREW *et al.*, 2012) Os valores de identidade obtidos indicam que se trata de uma provável nova espécie de potyvirus infectando naturalmente trapoerada. Todos

os isolados deste potyvirus foram coletados em campos comerciais de pimentão e os únicos potyvirus no Brasil relatados até o momento em pimentão são o PVY e PepYMV (MOURA *et al.*, 2012). Curiosamente estas duas espécies não foram identificadas em nenhuma das plantas daninhas analisadas.

Pela análise filogenética da CP, pode-se verificar que o potyvirus encontrado em trapoeraba encontra-se mais próximo de um potyvirus exótico, o HarMV. Este vírus foi relatado em plantas de *Hardenbergia comptoniana*, uma leguminosa da Região Sudoeste da Austrália (Figura 2).

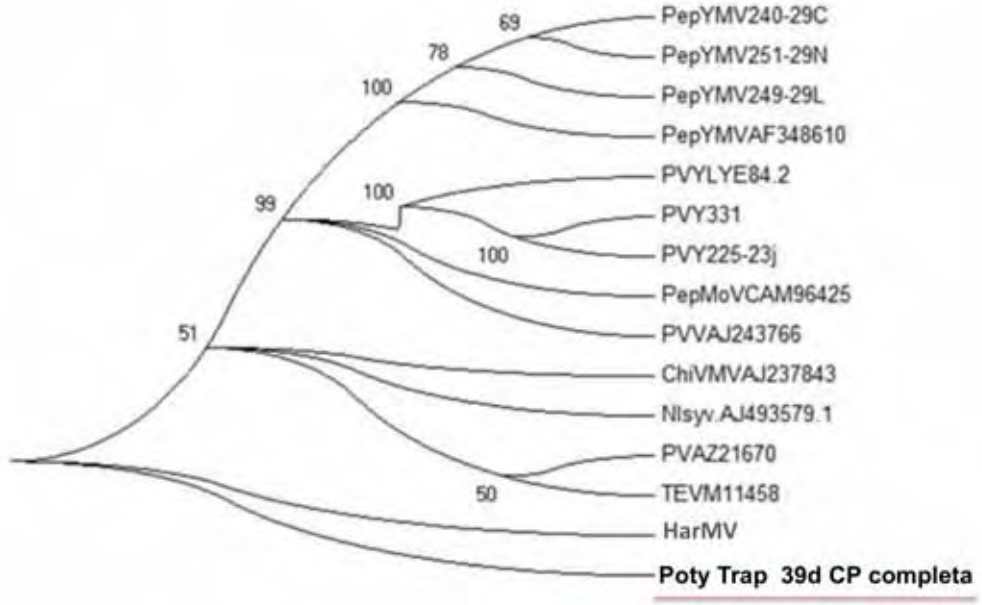

Figura 2 – Árvore filogenética obtida pelo programa Mega 5.0 com o valor de Bootstrap de 2000 repetições para a região codificadora para proteína capsidial. Espécies analisadas: *Pepper yellow mosaic virus* – PepYMV 29C (Acesso GenBank: HQ 594524), PepYMV 29N (Acesso GenBank: HQ 594518), PepYMV 29L (Acesso GenBank: HQ 594522), PepYMV strain DF (Acesso GenBank: AF 348610), *Potato virus Y* – PVY LYE84.2 (Acesso GenBank: AJ 439545), PVY – 331 (Acesso GenBank: HQ 594528), PVY 23J (Acesso GenBank: HQ 594529), *Pepper mottle virus* – PepMoV (Acesso GenBank: CAM 96425), *Potato virus V* – PVV (Acesso GenBank: AJ 243766), *Chilli veinal mottle virus* – ChiVMV (Acesso GenBank:

AJ 237843), *Narcissus late season yellow virus* – NLSYV (Acesso GenBank: AJ 493579), *Potato virus A* – PVA (Acesso GenBank: Z21670), *Tobacco etch virus* – TEV (Acesso GenBank: M11458), *Hardenbergia mosaic virus* – HarMV (Acesso GenBank: JF 427597) e a sequencia de nucleotídeo referente a proteína capsidial (CP) do isolado de potyvirus 39d de trapoeraba.

Duas arvores também foram geradas utilizando-se as sequencias parciais para as proteínas CI e NIb. Para a CI não houve um agrupamento claro, enquanto que para a NIb pode ser observada maior proximidade com o vírus *Chilli veinal mottle virus* – ChiVMV, relatado em *C. annuum* na Malásia (BURNETT, 1947) (Figura 3).

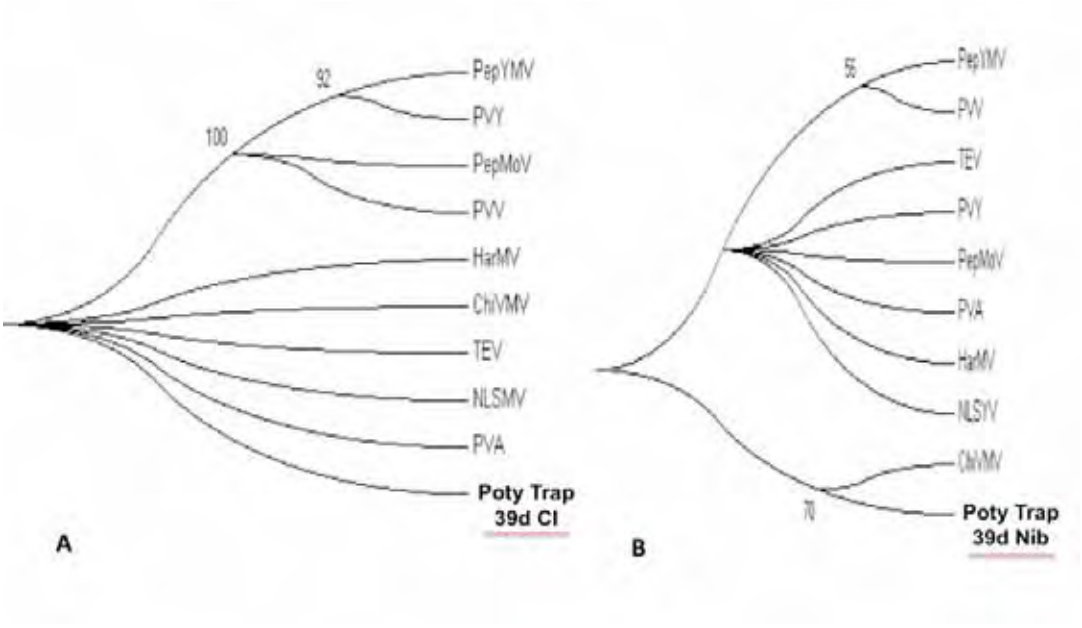

Figura 3 – Árvores filogenéticas obtidas pelo programa Mega 5.0 com o valor de Bootstrap de 2000 repetições para parte da região codificadora das proteína CI (a) e NIb (b). Amostras analisadas: *Pepper yellow mosaic virus* – PepYMV (Acesso GenBank: NC 004327), *Potato virus Y* – PVY (Acesso GenBank:JF 927763), *Pepper mottle virus* – PepMoV (Acesso GenBank: NC 001517), *Potato virus V* (Acesso GenBank: NC 004010), *Chilli veinal mottle virus* – ChiVMV (Acesso GenBank: NC 005778), *Narcissus late season yellow virus* – NLSYV (Acesso GenBank: JQ 326210), *Potato virus A* – PVA (Acesso GenBank:NC 004039), *Hardenbergia mosaic virus* – HarMV (Acesso GenBank: NC 015394), *Tobacco etch*

virus – TEV (Acesso GenBank: NC 001555) e a sequencia de nucleotídeo referente as proteínas CI e Nib do isolado de potyvirus 39d de trapoeraba.

Os domínios conservados QMKAAA, WCIEN e VWTMMDGDE, frequentemente encontrados na região codificadora para a proteína capsidial dos potyvirus, foram observados na CP do potyvirus-trapoeraba. Não foi observada a sequencia YAFDFYE e DAG, tendo sido esta substituída pela sequencia DAN na CP do potyvirus em trapoeraba. De acordo com Atreya *et al.* (1991) os aminoácidos DAG, observados na região N-terminal da CP estão relacionados com a transmissão dos potyvirus por afídeos. Foi verificado que um isolado do *Turnip mosaic virus* (TuMV), com a sequencia de aminoácidos DAN em substituição ao domínio DAG, não foi transmitido por afídeos. É intrigante porém que o potyvirus foi encontrado em 17 plantas de trapoeraba coletadas em duas áreas de produção de pimentão distante uma da outra.

O potyvirus-trapoeraba possui uma alta especificidade com esta hospedeira, não tendo sido transmitido, por extrato vegetal, para nenhuma das hospedeiras testadas. Os potyvirus relatados em trapoeraba em outras regiões do mundo, também são descritos como altamente específicos à família Commelinaceae (BAKER & ZETTLER, 1988; MEDBERRY *et al.*, 1990). O mesmo parece para o potyvirus encontrado aqui no Brasil.

Os resultados obtidos das análises biológicas e moleculares indicam a presença de um novo vírus do gênero *Potyvirus* em trapoeraba. Os vírus de RNA, como os potyvirus, são caracterizados por replicação rápida e taxas de mutação elevadas, o que resulta em um enorme potencial evolutivo (DOMINGO *et al.*, 2008). A identificação de novos vírus, ainda que não causem danos econômicos na agricultura, é importante, devido a crescente presença de populações de vírus emergentes. Prever o momento em que as populações de vírus presentes em hospedeiros alternativos irão adquirir a capacidade de infectar com sucesso os indivíduos de uma nova espécie hospedeira, adaptar-se a ele e, eventualmente, transformar em uma epidemia é um processo complexo, porém que auxiliaria bastante na prevenção de epidemias. O seqüenciamento completo do potyvirus encontrado em trapoeraba é importante para analisar a evolução genética da espécie e sua relação com outros vírus do gênero. Sugere-se o nome de Commelina mottle virus (ComMoV) para a possível nova espécie de potyvirus identificada em trapoeraba no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrew MQ King, Elliot Lefkowitz, Michael J. Adams, Eric B. Carstens (2012) Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1327p.

Atreya PB; Atreya CD; Pirone TP (1991) Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. Proceedings of the Nacional Academy of Sciences USA 88: 7887-7891.

Baker CA; Zettler FW (1988) Viruses infecting wild and cultivated species of the Commelinaceae. Plant Disease 72: 513-518.

Bertheau YD et al. (1998) DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) In: Perombelon, MCM; Van Der Wolff, JM. Methods for the detection and quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica on potatoes. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication.

Boari AJ; Maciel-Zambolim E; Carvalho MG; Zerbini FM (2000) Caracterização biológica e molecular de isolados do Cucumber mosaic virus provenientes de oito espécies vegetais. Fitopatologia Brasileira, 25: 49-58.

Burnett, F (1947). Report on Agriculture in Malaysia for the Year, p.85.

Domingo E, Parrish CR, Holland, F. Eds J (2008) Eds J. Origin and evolution of viruses. Academic Press.

Duarte LML, Rivas, EB, Alexandre MAV, Ferrari JT (1994) Detection of CMV isolates from commelinaceae species. Fitopatologia Brasileira, Brasilia 19: 48-53.

Gibbs A, Mackenzie A (1997) A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. Journal of Virological Methods. 63:9-16.

Ha, C, Coombs S, Revill PA, Harding RM, Vu M, Dale JL (2008) Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Archives of virology 153: 25-36.

Lorenzi, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional (1994) Nova Odessa: Plantarum, 336p.

Medberry SL, Lockhart BEL, Olszewski NE (1990) Properties of Commelina yellow mottle virus's complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. Nucleic Acids Research 18: 5505.

Migliori, A and Lastra, R (1978) Etude de virus presents chez Commelina diffusa Burm. En Guadeloupe. Annls. Phytopathology 10: 467.

Morales, FJ and Zettler, FW (1977) Characterization and Electron Microscopy of a Potyvirus Infecting Commelina diffusa. Phytopathology 67: 839.

Moura MF, Marubayashi J, Mituti T, Gioria R, Kobori, RF, Pavan M.A, Krause-Sakate R (2012) Análise comparativa da região codificadora para a proteína capsidial de isolados de PepYMV e PVY coletados em pimentão. Summa Phytopathologica 38: 93 - 96.

Nunes MA, Bergamini M, Coerini LF, Bastianel M, Novelli MV, Kitajima EW, Freitas-Astúa J (2012) Citrus leprosis virus C infecting Commelina benghalensis a prevalent weed orchards in Brazil. Plant Disease 96: 770.

Pappu SS, Brand R, Pappu HR, Rybicki EP, Gough KH (1993) A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3’ sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. Journal Virol. Methods 41: 9-20.

Tamura K et al (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. Oxford 22: 4673-4680.

Zheng L, Rodini BC, Gibbs, MJ, Gibbs AJ (2010) A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant Pathology 59: 211-220.

CAPÍTULO 2

Titulo: *Solanum americanum*: reservatório de *Potato virus Y* e *Cucumber mosaic virus* em áreas de cultivo de pimentão. *Solanum americanum*: reservoir of *Potato virus Y* and *Cucumber mosaic virus* in sweet pepper cultivation areas

Redigido em inglês conforme as normas da revista *Summa Phytopathologica*

Solanum americanum: reservoir of *Potato virus Y* and *Cucumber mosaic* virus in sweet pepper cultivation areas.

Moura, M.F., Soman, M., Pavan, M.A., Krause-Sakate, R.

Faculdade de Ciências Agronômicas, FCA-UNESP, Departamento Proteção Vegetal, Rua José Barbosa de Barros, 1780, CEP: 18610-307, Botucatu, SP, Brazil.

ABSTRACT

Weeds can act as important reservoirs for viruses. *Solanum americanum* (Black nightshade) is a commom weed in Brazil and samples with mosaic symptoms were collected in sweetpepper's crops to verify the presence of viruses. One sample showed mixed infection between *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Potato virus Y* (PVY) and one showed simple infection by PVY. The CMV and PVY could be sap transmitted and caused mosaic symptoms in tomato (*Solanum lycopersicum* cv Santa Clara), sweetpepper (*Capsicum annuum* cv Magda), *Nicotiana benthamiana* and *N. tabaccum* "TNN; local lesions on *Chenopodium quinoa*, *C. murale* and *C. amaranthicolor*. The coat protein sequences for CMV and PVY from Black nightshade isolates were more closely related to isolates from tomato. We conclude that *S. americanum* can act as mixing vessels and reservoirs for viruses during and between sweetpepper cropping seasons.

Key-words: Weeds, *Cucumovirus*, *Potyvirus*

RESUMO

As plantas daninhas podem atuar como importantes reservatórios de vírus. *Solanum americanum* (Maria Pretinha) é uma planta daninha comum no Brasil e amostras com sintomas de mosaico foram coletadas em áreas produtoras de pimentão, para verificar a presença de vírus. Uma amostra apresentou infecção mista com *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Potato virus Y* (PVY) e uma amostra apresentou infecção simples com PVY. As duas espécies virais foram transmitidas por extrato vegetal e ocasionaram sintomas de mosaico em tomate (*Solanum lycopersicum* cv Santa Clara), pimentão (*Capsicum annuum* cv Magda), *Nicotiana benthamiana* e *N. tabaccum* "TNN; lesões locais em *Chenopodium quinoa*, *C. murale* e *C. amaranthicolor*. As seqüências de proteína capsidial para o CMV e PVY encontrados em *S. americanum* estão filogeneticmente mais relacionados com isolados de tomate. Conclui-se que *S. americanum* pode atuar como reservatório de diferentes vírus, durante e entre as épocas de cultivo de pimentão.

Palavras-chave: plantas daninhas, *Cucumovirus*, *Potyvirus*

INTRODUCTION

Solanum americanum Mill. (black nightshade) is an annual plant classified in Solanaceae's family. In Brazil, this species is commonly found in tomate and pepper cultivation areas. Species of begomoviruses (1), tospoviruses (2), *Potato virus Y* (PVY) (3) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) (4) were already been reported in this host.

S. americanum plants showing mosaic symptoms and leaf distortion were naturally found in sweet pepper crops in São Paulo State (Lins region, October 2011) and the presence of viruses was investigated (Figure 1).

Figure 1 – Mosaic symptoms and leaf distortion on *Solanum americanum* collected on the field: isolate 71d (A), and isolate 72d (B).

Double-antibody sandwich (DAS)-ELISA for the presence of potyvirus genus was done with antiserum anti-potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN). Two potyvirus positive samples (71 and 72d) were also analyzed by leaf dip in electron microscope and filamentous particles with 800 nm, like potyvirus type, were observed for both samples. Presumed isometric particles were observed on sample 72d (Figure 2).

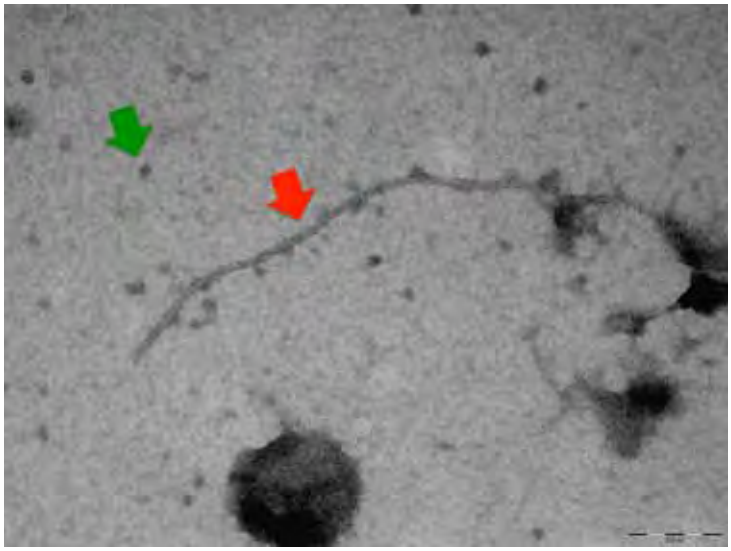

Figure 2 - Electron micrographs of potyvirus particle (red arrow) and presumed isometric particles from cucumovirus (green arrow) (92.000 X).

For the biological tests, sap of the leaves samples 71d and 72d were prepared in 0.02 M phosphate buffer pH 7.0 and inoculated on *Nicotiana tabaccum* "TNN", *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, sweet pepper (*Capsicum annuum* cv. "Magda") and tomato (*Solanum lycopersicum* cv "Santa Clara"). Mottle on sweet pepper, *N. benthamiana*, *N. tabaccum* TNN and tomato, and local lesions on *C. quinoa, C. murale, C. amaranticolor* were observed for samples 71d and 72d.

Total RNA was extracted from the original plants and also for the inoculated plants using the protocol described by (5), RT-PCR was performed with primers pair WCIEN (5' ATG GTT TGG TGY ATY GAR AAT 3') (6) and PV1 (5' GAT TTA GGT GAC ACT ATA GTT TTT TTT TTT TTT TTT 3') (7), a general primers for *Potyvirus* genus. To detect CMV the primers pair 035-3 (5' GCC GTA AGT GGA TGG ACA A 3') and 038-8 (TAT GAT AAG AAR CTT GTT TCG CG 3') were used (8), in a one-step reverse transcription (RT)-PCR assay using the cycle 42 °C/30 min, 95 °C /2 min and 35 cycles of 94 °C/ 1 min, 55 °C/ 2 min and 72 °C/ 2 min, ending with 72 °C / 5 min.

For the potyvirus fragment, a nucleotide identity of 94% was observed with PVY (GenBank Accession No AJ439545.1). To amplify the complete coat protein of the PVY primers pair PepNib (5' GWTSGYYGMMTTGGATGATG 3') and PepUTR (5' AGTAGTACAGGAAAAGCC 3') were used as described by (9) and the sequence compared

with those deposited in GenBank using the Blastn (http://www. ncbi.nlm.nih.gov/BlAST) and Clustal W (http://www. ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html) programs. For the complete CP, a nucleotide sequence identity of 97% was observed with PVY (GenBank Accession No HQ594528.1) for sample 72d (GenBank Submission No 1602271). A mixed infection between PVY (GenBank Submission No. 1602256) and CMV (GenBank Submission No. 1602253) was observed for sample 71d and confirmed by the nucleotide identity of 99% with PVY (GenBank Submission No. 1602256) and 96% with CMV (GenBank Accession No. JN054635.1).

Both, PVY and CMV found in *S. americanum* are closely related to isolates collected from tomato (Figure 3 and 4), despite the fact that this isolate has been collected in sweetpepper's crops. The biological experiments confirmed that CMV and PVY from *S. americanum* can infect tomato and sweetpepper, being this host a reservoir for these viruses during and between the sweet pepper seasons. *S. americanum* have already been reported as an important reservoir of CMV in sweet pepper crops (4).

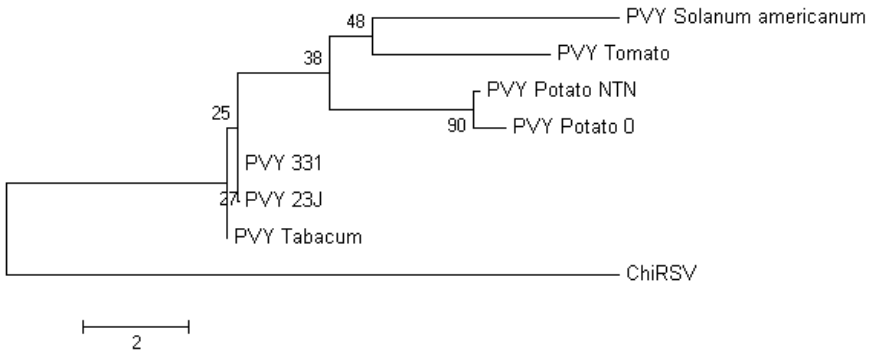

Figure 3 - Phylogenetic tree obtained by the program Mega 5.0, bootstrap value 2000 replicates based on the nucleotides sequences of the CP coding region: *Potato virus Y* (Isolate 71d), PVY tomato (GenBank Access: JF 804783), PVY potato NTN (GenBank Access: JQ 924285), PVY potato 0 (GenBank Access: JQ 924285), PVY Capsicum 331 (GenBank Access: HG 594528), PVY Capsicum 23J (GenBank Access: 594529), PVY Tabacum (GenBank Access: JN 711118). Outgroup *Chilli ringspot virus* (GenBank Access: DG 925438).

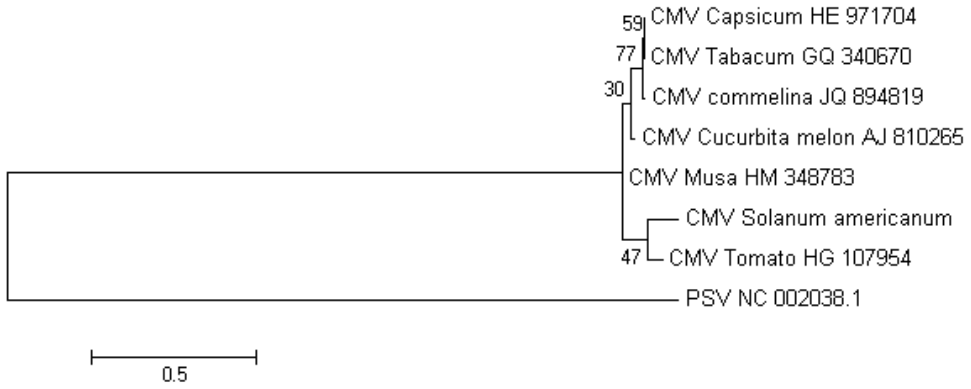

Figure 4 - Phylogenetic tree obtained by the program Mega 5.0, bootstrap value 2000 replicates for the nucleotides coding region of the coat protein. CMV Tomato (GenBank Access: HQ 107954), CMV melon (GenBank Access: AJ 810265), CMV Capsicum (GenBank Access: HE 971704), CMV tabacum (GenBank Access: GQ 340670), CMV commelina (GenBank Access: JQ 894819), CMV musa (HM 348783). Outgroup *Peanut stunt virus* (PSV) (GenBank Access: NC 002038.1).

In São Paulo, PepYMV is the potyvirus more frequently found infecting sweet pepper and occasionally, infections by CMV and PVY (pathotype zero) could be observed (10). The increase use of pepper resistant material for PVY can explain the low incidence of PVY in this culture (10). Understanding the epidemiological role played by reservoir plants in the maintenance of viral diversity and in the acquisition of novel or enhanced virulence towards the cultivated host can help to improve resistance gene management.

In many instances, an emerging disease appears when a pathogen “jumps” to another host that it was not infecting (or no longer infecting) and adapts (or readapts) to it (11). RNA viruses, like CMV and PVY, are likely to evolve in a reasonable experimental time because they have large population size, fast replications rates, and a high mutation rate (12).

Thus, observe the incidence of *potyvirus* and *cucumovirus* periodically in producing areas of Solanaceae is important in order to verify the possibility of a re-emergence of PVY and CMV, since these virus are still present in the field, preferentially in weed species, not in cultivated plants. This result shows the high adaptability of important viruses in weeds such as

black nightshade. We conclude that *S. americanum* is a natural reservoir of viruses and can act as a mixing vessels for different viruses to solanaceous in Brazil.

REFERENCES

1. BARBOSA, J.C., BARRETO, S.S, INOUE-NAGATA, A.K., REZENDE, J.A.M. Characterization and Experimental Host Range of a Brazilian Tomato Isolate of Tomato severe rugose virus. Journal of Phytopathology n. 159, p.644–646, 2011.

2. LIMA, M.G.A., MARTINELLI, N.M., MONTEIRO, R.C. Ocorrência de Frankliniella schultzei (TRYBOM) (THYSANOPTERA: THRIPIDAE) em plantas daninhas. Planta Daninha, v. 18, n. 2, 2000.

3. COSTA, A.S., CARVALHO, A.M.B., KITAJIMA, E.W. Risca de tomateiro em São Paulo causada por estirpe do virus Y. **Bragantia**, v.19, n.67, p.1111-1127, 1960.

4. MORAES, C.A.P., CHAVES, A.L.R., EIRAS, M., GALETTI, S.R., COLARICCIO, A. Solanum americanum uma fonte potencial de inoculo de Cucumber mosaic virus em plantação de pimentão. IN: XXVII Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas, **Revista Summa Phytopathologica**. Botucatu, v.30, p.127-128, 2004.

5. BERTHEAU, Y.D., et al. Methods for the Detection and Quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica on Potatoes. M. C. N. Perombelon and J. M. van der Wolff, eds. **Scottish Crop Research Institute**, Dundee, U.K., 1998.

6. PAPPU, S.S., BRAND, R., PAPPU, H.R., RYBICKY, E.P.; GOUGH, K.H. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. **Journal Virol. Methods**. v.41, p.9-20. 1993.

7. GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**. v.63, p.9-16, 1997.

8. BOARI, A.J.; MACIEL-ZAMBOLIM, E., CARVALHO, M.G., ZERBINI, F.M. Caracterização biológica e molecular de isolados do Cucumber mosaic virus provenientes de oito espécies vegetais. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.49-58, 2000.

9. MOURA, M.F., MITUTI, T., MARUBAYASHI, J.M., GIORIA, R., KOBORI, R.F., PAVAN, M.A., SILVA, N., KRAUSE-SAKATE, R. A classification of Pepper yellow mosaic virus isolates into pathotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v.131, n.4, p. 549-552, 2011.

10. MOURA, M.F. Variabilidade de Potyvirus infectando Capsicum spp. no Estado de São Paulo. 2009, 89p. (Dissertação de Mestrado) - Curso de Agronomia (Proteção de Plantas), UNESP – Faculdade de Ciências Agronômicas, Campus de Botucatu, Botucatu.

11. BEDHOMME, S., LAFFORGUE, G., ELENA, S.F. Multihost Experimental Evolution of a Plant RNA Virus Reveals Local Adaptation and Host-Specific Mutations. **Molecular Biology and Evolution**, v.29, p.1481–1492, 2012.

12. ELENA, S.F., SANJUAN, R. Virus evolution: insights from an experimental approach. Annual Review Ecology Evolution, v:38, p.27–52, 2007.

CAPÍTULO 3

Título: Comportamento de genótipos de alface ao *Lettuce mosaic virus* e caracterização do alelo eIF4E. Reaction of lettuce genotypes to *Lettuce mosaic virus* and characterization of the eIF4E allele.

Redigido em português conforme as normas da revista *Tropical Plant Pathology*

Comportamento de genótipos de alface ao *Lettuce mosaic virus* e caracterização do alelo eIF4E. Reaction of lettuce genotypes to *Lettuce mosaic virus* and characterization of the eIF4E allele. *Moura, M.F; *Silva, N., *Hoffmann, M.I.M.; *Pavan, M.A.; **German-Retana, S.; *Krause-Sakate, R.

*UNESP-FCA (Botucatu), Rua José Barbosa de Barros, 1780, Departamento de Proteção Vegetal – Laboratório de Virologia Vegetal.

**INRA, UMR BFP 1332, BP 81 - Villenave d'Ornon, France

E-mail: renatekrause@fca.unesp.br

RESUMO

O *Lettuce mosaic virus* é um dos principais problemas fitossanitários que ocorrem na cultura da alface (*Lactuca sativa* L.). Os isolados LMV-Most são capazes de contornar a resistência dos alelos recessivos *mo1*^{1} *e mo1*^{2} encontrados em alface e não há até o momento variedades resistentes no mercado. Estes alelos recessivos codificam o fator de tradução eucariótico eIF4E, também relacionado com resistência recessiva a potyvirus em outras espécies vegetais. Neste trabalho 8 genótipos de alface pertencentes a uma coleção da FCA/UNESP-Botucatu foram avaliados para reação à inoculação com o isolado AF-199 (LMV-Most) e presença de possíveis variações no eIF4E. Para a variedade Calona e Salinas-88, utilizadas como controle e descritas como portadoras dos alelos recessivos *mo1*^{1} e *mo1*^{2}, respectivamente, foi observado o padrão do eIF4E^{1} e eIF4E^{2}. Todos os demais genótipos analisados obtiveram o padrão eIF4E^{0} (*mol*^{0}), típico padrão de suscetibilidade. Alguns destes genótipos apresentaram fenótipos como retardo no aparecimento de sintomas e mosaico inicialmente restrito às folhas inoculadas. Estes sintomas não puderam ser correlacionados a variações do eIF4E. A metodologia de detecção e caracterização do eIF4E em alface poderá auxiliar o trabalho de melhoristas na seleção de fontes de resistência ao LMV.

Palavras-chave: tolerância, genes recessivos, potyvirus, eIF4E

ABSTRACT

Lettuce mosaic virus is one of the major viruses occurring on lettuce (*Lactuca sativa* L.). LMV-Most are able to overcome the resistance of the recessive genes *mo1*^{1} and *mo1*^{2} found in lettuce and so far as we know there are no resistant or tolerant varieties for them. These recessive genes encode the eukaryotic translation factor eIF4E, also related to the recessive potyvirus resistance in other plant species. In this work lettuce genotypes belonging to a collection of FCA / UNESP-Botucatu were inoculated with the isolate AF-199 (LMV-Most) and the presence of possible variations in the eIF4E gene evaluated. For the varieties Calona and Salinas-88, previously reported with the tolerant genes *mo1*^{1} and *mo1*^{2}, respectively, a nucleotide sequence eIF4E^{1} and eIF4E^{2} was observed. The sequence for the others genotypes analyzed was highly conserved and typical for eIF4E^{0} (*mol*^{0}), the susceptible genotype. Interestingly, some of these genotypes showed delay in symptons appearing and attenuated symptoms. These phenotypes could not correlate with variability's in the eIF4E sequence. The eIF4E gene can be used as a target gene in development of genetic resistance to viruses.

Key-words: tolerance, recessive genes, potyvirus, eIF4E

INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma folhosa pertencente à família Asteraceae e é uma das hortaliças mais consumidas no Brasil. Em 2011 a área cultivada no estado de São Paulo foi de 10.327,75 ha com uma produtividade de 28.815 ton. no primeiro semestre deste mesmo ano (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA – AGRIANUAL, 2012; IEA www.iea.sp.gov.br).

Entre os principais vírus que podem infectar a cultura cita-se o *Lettuce mosaic virus* (LMV) ocasionando perdas significativas na cultura (PAVAN *et al*., 2008). Os isolados de LMV apresentam uma grande variabilidade biológica, podendo ser classificados em dois grandes grupos denominados de LMV-Common, que reúne os isolados que infectam cultivares de alface suscetíveis, e o grupo LMV-Most que engloba os isolados capazes de contornar os alelos recessivos *mol*^{1} e *mol*^{2} (KRAUSE-SAKATE *et al.*, 2002). Até o momento não existem variedades resistentes ou tolerantes aos LMV-Most (PAVAN *et al*., 2008) e apesar destes isolados não predominarem nos campos de produção de alface comercial do Estado de São Paulo (FIRMINO *et al.*, 2008), dada a relevância que a cultura possui no Brasil, é necessária a busca por possíveis novas fontes de resistência ao LMV.

A resistência a vírus por meio do uso de genes recessivos é a mais comumente utilizada (WANG & KRISHNASWAMY, 2012). Como os vírus são totalmente dependentes da maquinaria celular para completar o seu ciclo na planta, a perda ou mutação de um fator no hospedeiro essencial ao ciclo viral pode levar a uma resistência recessiva da planta ao vírus. Até o momento, todos os genes recessivos envolvidos na interação planta-vírus foram caracterizados como codificadores de fatores de iniciação de tradução eucarióticos (eIFs), dentre estes o eIF4E, eIF4G e isoformas. Há pelo menos 14 genes de resistência recessivos naturais contra vírus de plantas caracterizados, dos quais 12 destes codificam o eIF4E ou sua isoforma (WANG & KRISHNASWAMY, 2012).

No caso da alface estudos demonstraram que os alelos recessivos *mo1*^{1} e *mo1*^{2} de alface codificam o fator de transcrição eucariótico eIF4E (NICAISE *et al.*, 2003). A sequência nucleotídica deste fator é conservada, porém em posições específicas ocorrem pequenas variações ou deleções que caracterizam a suscetibilidade ou tolerância observada em variedades de alface a diferentes isolados de LMV (NICAISE *et al.*, 2003). Dependendo do isolado de LMV, o gene *mo1* confere imunidade (ausência de acumulação viral nas plantas

inoculadas) ou tolerância, com ausência de sintomas, porém, com acumulação viral (GERMAN-RETANA *et al.*, 2008). Há dois fatores de avirulência do LMV que interagem com o eIF4E, a VPg e a região C-Terminal da CI, que dependendo do isolado viral possibilita que este contorne a resistência conferida pelos alelos *mo1*^{1} e *mo1*^{2} (ABDUL-RAZZAK *et al*., 2009).

Neste trabalho genótipos de alface provenientes de uma coleção mantida na FCA/UNESP-Botucatu foram inoculados com um isolado de LMV (AF-199) previamente classificado como LMV-Most (KRAUSE-SAKATE *et al.*, 2002) e a região codificadora do fator eucariótico eIF4E seqüenciado e analisado para presença de possíveis variações. Foram inoculadas as variedades Calona e Salinas-88, sabidamente portadoras dos genes *mo1*^{1} e *mo1*^{2} respectivamente, Sierra, Robson, Rafaela, Laurel e os genótipos 169501, 169501C, 172918A, 162499. As sementes de alface foram semeadas e coletadas folhas individuais 15 dias após a emergência e 60 dias após o plantio, a fim de analisar qual a melhor época para amplificação do gene. A inoculação do LMV-AF-199 foi realizada três vezes consecutivas com intervalo de 1 dia, utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,0 e o abrasivo Carborundum (600 mesh) misturado no inóculo após o seu preparo. Foram realizados 3 ensaios com 3 plantas por genótipo em cada ensaio. O RNA total foi extraído utilizando-se o kit de extração InviTrap Spin Plant RNA Kit e Total RNA Purification Norgen, seguindo as recomendações dos fabricantes. Para amplificação do eIF4E foi utilizado o par de oligonucleotídeos, descrito previamente (NICAISE *et al.*, 2003), denominados Ls4E3f (3' GGGGGGGTGGAAGAAATA 5') e Ls4E813r (3' GCAGAATTGTAGCATAAATCGGG 5'). A reação de RT-PCR foi realizada em uma só etapa utilizando-se o Kit de PCR Master Mix (FERMENTAS). Para um volume final de 25 µL foram adicionados: 5 µL de produto de extração de RNA, 12,5 µL de tampão Master Mix, 1 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, Promega, 15 u/µl) e água DEPC para completar o volume. O ciclo utilizado consistiu em 30 minutos a 42 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C e 40 ciclos de 95 °C/30 segundos, 54 °C/1 minuto e 72 °C/1 minuto e finalizando com 72 °C/10 minutos.

As alfaces Sierra, Robson, Rafaela, Laurel, Calona e Salinas-88 apresentaram os primeiros sintomas do LMV-AF199 em média, aos 7 dias após a inoculação e estes evoluíram para mosaico e deformação foliar. Necrose e morte da planta foram observadas em Salinas-88, como previamente já verificado neste material quando inoculado com o isolado AF-199. Foi

observada suscetibilidade ao LMV-AF-199 nos genótipos 169501, 169501C, 172918A, 162499, porém os sintomas foram visíveis a partir dos 10 dias após a inoculação. Os sintomas se iniciaram nas folhas inoculadas e lentamente progrediam para as folhas mais jovens, enquanto que nos demais genótipos os sintomas sempre foram verificados inicialmente nas folhas mais jovens (Figura 1).

Figura 1. Sintomas de mosaico tardio observados nos genótipos de alface 169501C (a) e 162499 (b). Os sintomas se iniciaram nas folhas inoculadas e evoluíram lentamente para as folhas mais jovens.

As sequências do eIF4E das alfaces estudadas foram analisadas pelos programas CLUSTAL Interative W (THOMPSON *et al.*, 1994) e Mega 5 (TAMURA *et al.*, 2011) (Figura 2). Pôde-se observar que os genótipos de alface 169501, 169501C, 172918, 162499 e as cultivares Sierra, Robson, Rafaela, Laurel apresentaram padrão eIF4E^0 (*mol^0*), característico para o alelo de suscetibilidade, conforme descrito (NICAISE *et al.*, 2003). As alfaces Calona e Salinas-88, portadores dos genes *mo1^1* e mo1^2, respectivamente, apresentaram padrão típico para o eIF4E^1 e eIF4E^2.

A sequência dos alelos de eIF4E é conservada dentro de uma mesma espécie vegetal, com exceção de poucas regiões implicadas na resistência ou suscetibilidade desta espécie aos vírus (WANG & KRISHNASWAMY, 2012). No caso de alface o padrão do eIF4E

claramente define a suscetibilidade ou resistência do genótipo aos isolados capazes de contornar a resistência dos alelos recessivos *mo1*[1] e *mo1*[2] (NICAISE *et al.*, 2003). Neste trabalho não foi observada nenhuma variabilidade no eIF4E nos genótipos analisados, apesar de fenotipicamente expressarem sintomas diferentes à inoculação viral. A suscetibilidade destas plantas ao LMV, expressada pela variabilidade fenotípica, possivelmente está relacionado a outro componente do genoma da planta.

Observou-se também que a detecção do eIF4E por RT-PCR é mais eficiente a partir de folhas coletadas de plantas jovens quando comparadas a plantas velhas (60 dias). Somente na alface Sierra o eIF4E pôde ser detectado em folhas coletadas em diferentes idades. O eIF4E é um fator de tradução presente durante todo o ciclo da planta, porém pode ser expresso diferencialmente durante o desenvolvimento ou em resposta a diferenças ambientais (biótica ou abiótica) (GALLIE *et al.*, 1998). No caso de cereais, os níveis de eIF4E aumentam no início à metade do desenvolvimento da planta, seguido por uma diminuição quando a planta inicia a produção de sementes (GALLIE *et al.*, 1998). No caso da alface, aos 60 dias coincidentemente as plantas também estavam iniciando a emissão do pendão floral.

```
                                                          228
1110Salinas88    CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTCCTAAGTCCAAG 202
1102.169501      CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 176
GenBank32698523  CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 184
Robson           CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 184
1105.172918A     CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 221
Laurel           CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 184
Rafaela          CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 207
1109Calona       CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 226
1103.169501C     CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 237
1106.162499      CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 237
1115Sierra       CAGCATCCGCTCGAGCATTCTTGGACTTTCTGGTTCGATACTCCCTCTGCTAAGTCCAAG 238

                                                                      299
1110Salinas88    CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 262
1102.169501      CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 236
GenBank32698523  CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 244
Robson           CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 244
1105.172918A     CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 281
Laurel           CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 244
Rafaela          CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 267
1109Calona       CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTT 286
1103.169501C     CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 297
1106.162499      CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 297
1115Sierra       CAAGTCGCTTGGGGTAGTTCCATGCGCCCTATCTACACTTTCTCCTCCGTTGAAGAGTTC 298

                                                      344-349
1110Salinas88    TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 322
1102.169501      TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 296
GenBank32698523  TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 304
Robson           TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 304
1105.172918A     TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 341
Laurel           TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 304
Rafaela          TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 327
1109Calona       TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCA------TGACTTCTAT 340
1103.169501C     TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 357
```

```
1106.162499      TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 357
1115Sierra       TGGAGTCTTTACAACAACATACATCGACCAAGCAAGTTGGCTCAAGGAGCTGACTTCTAT 358


1110Salinas88    TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 382
1102.169501      TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 356
GenBank32698523  TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 364
Robson           TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 364
1105.172918A     TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 401
Laurel           TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 364
Rafaela          TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 387
1109Calona       TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 400
1103.169501C     TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 417
1106.162499      TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 417
1115Sierra       TGTTTCAAGAATAAAATCGAGCCTAAGTGGGAAGACCCTGTTTGTGCTAATGGTGGAAAG 418


1110Salinas88    TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 442
1102.169501      TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 416
GenBank32698523  TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 424
Robson           TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 424
1105.172918A     TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 461
Laurel           TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 424
Rafaela          TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 447
1109Calona       TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 460
1103.169501C     TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 477
1106.162499      TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 477
1115Sierra       TGGACTATGACCTTTACCAAAGCAAAATCCGACACCTGTTGGCTGTATACGTTGCTAGCA 478


1110Salinas88    ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 502
1102.169501      ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 476
GenBank32698523  ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 484
Robson           ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 484
1105.172918A     ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 521
Laurel           ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 484
Rafaela          ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 507
1109Calona       ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 520
1103.169501C     ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 537
1106.162499      ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 537
1115Sierra       ATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGATATATGTGGAGCAGTTGTAAATGTTAGA 538


                                                576
1110Salinas88    GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 560
1102.169501      GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 533
GenBank32698523  GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 542
Robson           GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 542
1105.172918A     GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 579
Laurel           GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGTG--TATGAGAGTGCTCAGC 541
Rafaela          GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGTTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 565
1109Calona       GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATTCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 578
1103.169501C     GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 595
1106.162499      GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 595
1115Sierra       GCAAGGCAAGAAAAAATAGCTTTGTGGACCAAAAATGCTGCG--AATGAGAGTGCTCAGC 596
```

Figura 2: Alinhamento parcial dos nucleotídeos da região codificadora do fator de tradução eucariótico eIF4E nas alfaces Calona, Salinas-88, Sierra, Robson, Rafaela e Laurel e genótipos 169501, 169501C, 172918 e 162499. Número de acesso do eIF4E utilizado como padrão: 32698523.

Apesar da análise do eIF4E revelar a presença de um alelo de suscetibilidade, o retardo no surgimento dos sintomas nos genótipos analisados indica um potencial material para o melhoramento. O ciclo da cultura do alface é bem curto, em torno de 45 dias, e as mudas de alface são transferidas para o campo 15 dias após a emergência. Nos experimentos conduzidos neste trabalho, as plantas de alface foram inoculadas no início da fase da cultura. Portanto, o sistema natural de defesa da planta não está completamente estabilizado tornando-se mais suscetível a atuação de fitopatógenos. Mesmo com este entrave, observou-se o atraso no aparecimento dos sintomas, sendo estes pouco visíveis no início da infecção. Estes dados são importantes, pois caso a transmissão ocorra de maneira natural no campo por afídeos, é possível que a colheita seja feita antes do aparecimento dos sintomas, não prejudicando a aparência do produto. Além disso, a metodologia empregada para detecção do eIF4E demonstrou-se eficiente e uma ferramenta útil em programas de melhoramento genético a vírus, devendo esta ser sempre realizada concomitantemente com análises biológicas, podendo ser inclusive feita para diferentes espécies vegetais em que já há descrita a resistência recessiva à vírus.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado para a primeira autora.

REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

Abdul-Razzak A, Guiraud T, Peypelut M, Walter J, Houvenaghel M C, Candresse T, Le Gall O, German-Retana S. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against lettuce mosaic potyvirus. Mol Plant Pathol, v.10, p.109–113, 2009.

Anuário da Agricultura Brasileira – AGRIANUAL. Alface. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, p.137. 2012.

Firmino AC, Krause-Sakate R, Pavan MA, Silva N, Hanai SM, Anbo RH, NietzsheI T, Le Gall O. Prevalence of Lettuce mosaic virus - common strain on three lettuce producing areas from São Paulo State. Summa phytopathologica, vol.34, n.2, p.161-163, 2008.

Gallie DR, Le H, Tanguay RL, Browning KS. Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock. Plant Journal, n.14, p.715–722, 1998

German-Retana S, Walter J, Le Gall O. Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. Molecular Plant Pathology, v.9, p.127-136, 2008.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Disponível em: www.iea.sp.gov.br. Acesso em: 22 de outubro de 2012.

Krause-Sakate R, Le Gall O, Fakh H, Peypelut M, Marrakchi M, Varveri C, Pavan MA, Souche S, Lot H, Zerbini FM, Candresse T. Molecular characterization of Lettuce mosaic virus field isolates reveals the emergence and spread of a resistance-breaking strain, LMV-Most. Phytopathology, v.92, p.563-571, 2002.

Nicaise V, German-Retana R., Sanjuan R, Dubrana MP, Mazier M, Maisonneuve B, Candresse T, Caranta C, LeGall O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. Plant Physiology, v.132, p.1272-1282, 2003.

Pavan MA, Krause-Sakate R, Silva N, Zerbini FM, LeGall O. Virus Diseases of Lettuce in Brazil, Plant Viruses, n.2, v.1, p.35-41, 2008.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution v.28, p.2731-2739, 2011.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, Oxford, v.22, p. 4673-4680, 1994.

Wang A, Krishnaswamy S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. Molecular Plant Pathology, v.13, n.7, p.795-803, 2012.

CAPÍTULO 4

Título: Estudo *in vivo* da localização subcelular da proteína CI e seus parceiros virais VPg, P3NPIPO e do fator de tradução eucariótico eIF4E. *In vivo* study of the subcellular localization of the CI protein and the viral partners Vpg, P3NPIPO and the eukaryotic translation factor eIF4E.

*Mônika Fecury Moura, **Maud Sorel, **Luc Sofer, *Renate Krause-Sakate, **Sylvie German-Retana

*UNESP-FCA (Botucatu), Rua José Barbosa de Barros, 1780, Departamento de Proteção Vegetal – Laboratório de Virologia Vegetal.

**INRA, UMR BFP 1332, BP 81 - Villenave d'Ornon, France

E-mail: agromonika@yahoo.com.br

RESUMO

Os alelos recessivos *mo1*^{1} e *mo1*^{2}, que codificam o fator de iniciação de tradução eIF4e, conferem resistência absoluta ou tolerância dependendo do isolado de *Lettuce mosaic virus*. A VPg viral possibilita contornar o gene *mo1*^{1}, enquanto que a região C-terminal da CI (cylindrical inclusion) ambos os genes independentemente. A proteína CI desempenha importantes funções no ciclo viral sendo uma delas uma proteína essencial ao movimento intra e inter celular e replicação viral. Uma possibilidade é que a resistência mediada pelo eIF4E esteja associada com a dificuldade do vírus infectar sistemicamente a planta, ou de se mover célula a célula pela interação da VPg, CI e eIF4E. Deste modo o presente trabalho teve como objetivo verificar a localização subcelular das proteínas virais VPg, CI e P3NPipo do LMV e o fator eucariótico eIF4E de alface em plantas agroinfiltradas de *Nicotiana benthamiana,* hospedeira do LMV. Em plantas sadias, dois dias após a agroinfiltração das proteínas isoladas, a CI foi observada no citoplasma e núcleo, enquanto a VPg no núcleo e nucléolo. Na agroinfiltração conjunta de CI+VPg, a sub-localização da VPg foi alterada, tendo sido observada no citoplasma, nucléolo e núcleo. Em plantas de fumo infectadas pelo LMV-0 (construção com GFP e mcherry) e agroinfiltradas com CI+VPg, observou-se uma forte localização da VPg no citoplasma. Pontuações ao longo da membrana plasmática, presumivelmente associadas aos plasmodesmas, foram observadas em todos os ensaios em que a CI foi agroinfiltrada, independente da construção P3NPipo/VPg/eIF4e. A agroinfiltração de CI + P3NPipo e CI + eIF4E não causam alterações na localização das duas proteínas, tanto em plantas sadias quanto infectadas pelo LMV-0. Os ensaios permitiram concluir que a CI, na presença do vírus, é possivelmente direcionada aos plasmodesmas das células vegetais.

Palavras-chave: Potyvirus, proteínas virais, microscopia confocal

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Potyvirus* é um dos mais importantes e estudados entre os vírus de plantas., causando perdas significativas em culturas importantes como em alface, tomate e pimentão. Uma característica importante inerente ao gênero é a codificação de uma poliproteína que se autocliva em sítios específicos através de três proteases virais, gerando 10 proteínas multifuncionais que atuam no ciclo de infecção viral (ADAMS *et al*., 2005, CHUNG et al, 2008). Recentemente uma nova proteína foi descoberta e denominada de PIPO (Pretty Interesting Potyviridae ORF), incorporada na região N-terminal da proteína P3, lida na fase +2 (CHUNG *et al.* 2008). Estudos com PIPO revelam que ela está localizada nos plasmodesmas das células vegetais e que há uma interação com a proteína viral CI (Cylindrical Inclusion). A CI mutada do *Turnip mosaic virus* em *Nicotiana benthamiana* está envolvida diretamente no movimento célula a célula dos vírus, formando assim um complexo com a PIPO coordenando a formação de estruturas associadas aos plasmodesmas que facilitam o movimento viral (WEI *et al.*, 2010).

Entre os fatores da planta requisitados pelos potyvirus para a eficiente infecção viral encontra-se o fator de tradução eucariótico eIF4E. Alguns genes recessivos a potyvirus que codificam este fator, como por exemplo os genes localizados no lócus *pvr2* em pimentão e os genes localizados no lócus *mol*, que conferem tolerância ao *Lettuce mosaic virus* em alface (NICAISE *et al.*, 2003; CHARRON *et al.*, 2008).

A proteína VPg dos potyvirus é uma das mais bem descritas em relação as interações envolvendo o fator de tradução eucariótico 4E ou suas isoformas. Essa interação já foi verificada para diferentes genes recessivos, podendo-se citar vários patossistemas (revisado por WANG & KRISHNASWAMY, 2012). Apesar desses estudos comprovarem a interação entre a VPg + eIF4E, o motivo ou conseqüência dessa interação ainda não está completamente elucidado. O envolvimento na tradução do RNA viral é provável, mas a interação pode resultar na perturbação das algumas funções do hospedeiro ou mesmo ser necessária para tráfico célula-a-célula (GAO *et al*., 2004).

A proteína CI além de atuar no movimento viral célula a célula, possibilita a alguns isolados virais contornar a resistência conferida por genes recessivos. Em alface já foi

demonstrado que uma mutação na região C-terminal da CI, especificamente no aminoácido 621 desta proteína, foi suficiente para que ocorresse o contorno da resistência genética conferida pelos alelos *mol*^{1} *e mol2* (ABDUL-RAZZAK *et al*., 2009). Através de experimentos de fluorescência bimolecular (BiFC), Tavert-Roudet *et al.* (2012) demonstraram que o eIF4E interage com a região C-terminal da CI do LMV, entre os aminoácidos 372-643, confirmando mais uma vez o envolvimento da CI com a resistência recessiva conferida pelos genes localizados no lócus *mo*l.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi analisar *in vivo* a localização da CI, proveniente de um isolado de LMV-0, com o fator de tradução eucariótico eIF4E^{1} e eIF4E^{2} de alface, assim como analisar a CI na presença da Vpg e P3NPIPO, ambas também provenientes de um isolado de LMV-0. As localizações protéicas foram observadas em células de *Nicotiana benthamiana* sadias e infectadas pelo LMV-0, através de microscopia confocal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Construção dos plasmídeos

O Kit de clonagem Gateway Technology (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) foi utilizado para obtenção de todas as construções usadas neste trabalho. As regiões codificadoras dos genes da P3NPIPO, VPg e CI foram amplificados por PCR a partir de um isolado de LMV-0, utilizando a enzima Phusion DNA polymerase (New England Biolab). Para obter as sequências da P3NPIPO com e sem códons de parada no final da proteína, utilizou-se como estratégia a amplificação através PCRs da região C-terminal e N-terminal da proteína. Após a obtenção destes, realizou-se um último PCR de fusão entre as regiões C-terminal e N-terminal do gene (Figura 1). Para a obtenção da sequência do eIF4E^{1} (Alface var. Mantilia) e eIF4E^{2}, foram realizados PCRs com o primer senso pENT4Ep (5’ CACC ATG AAA TCG GAG GAG C 3’) e dois primers reversos pENT4Estopm (5’ TCA TAC TGT GTA TTT GTT TTT AGC AC 3’) e pENT4Enostopm (5’ TAC TGT GTA TTT GTT TTT AGC AC 3’) afim de adquirir fragmentos com codon stop e sem códon stop, respectivamente.

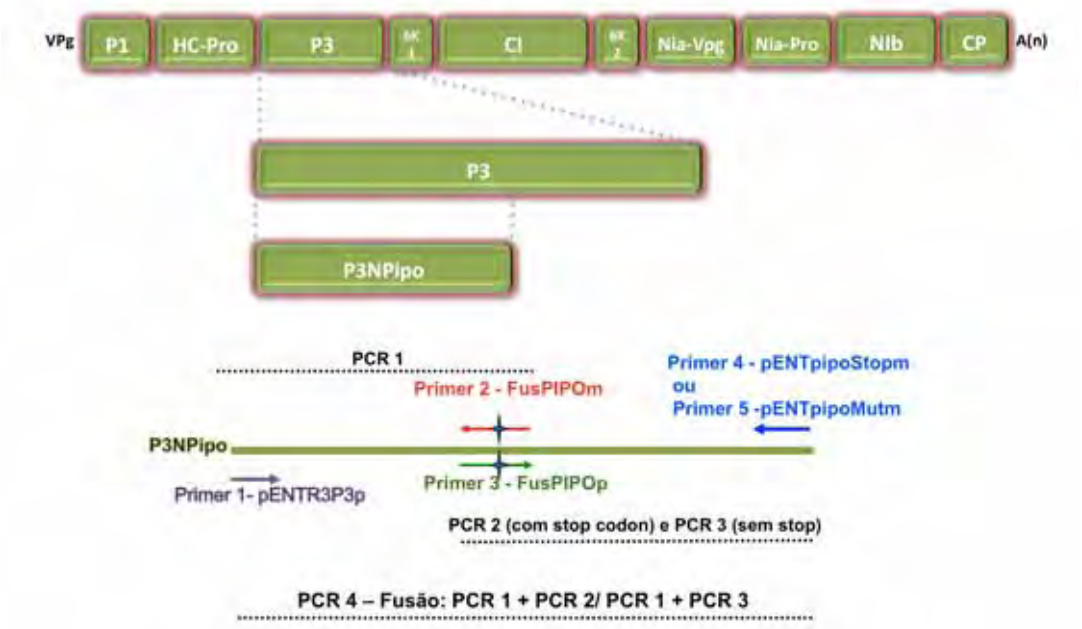

Figura 1 – Esquema utilizado para obtenção do fragmento completo do gene P3NPIPO com presença e ausência de stop codon na região N-terminal a serem clonados no vetor pENTR (Gateway Entry Vectors, Invitrogen).

Após o PCR, os fragmentos de DNA foram purificados com o Kit MSB Spin PCRapace (Invitek) e em seguida clonados no vetor pENTR/D-TOPO (2580bp) da Invitrogen, com resistência a kanamicina. A transformação foi realizada por choque térmico com a *Transforming One Shot Top 10* Competent *Escherichia coli*, de acordo com a recomendação do fabricante. As colônias obtidas foram selecionadas por PCR, utilizando-se o par de primer universal M13Fwd e M13Rev. As amostras positivas foram enviadas para sequenciamento para confirmação da sequência clonada (GATC Biotech - Bordeaux).

Para as construções obtidas e confirmadas pelo seqüenciamento, pENTR-PipostopC-2, pENTR4E[1] e pENTR4E[2]C-7, utilizou-se o vetor de destinação pB7WGR2, que possui a região N-terminal fusionada a *Red Fluorescent Protein* (RFP). O pENTR-VPg e pDONR-CI, previamente construídos, foram transferidos para os vetores de destinação final pB7FWG2 (N-terminal RFP) e pGWB705 (C-terminal GFP – *Green Fluorescent Protein*). A reação de tranferência foi realizada por recombinação usando a enzima LR Clonase II (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, realizou-se a transformação por eletroporação com *E. coli* competente. As células eletroporadas foram plaquedas em meio LB-

Agar contendo os antibióticos gentamicina (10 μg/ml) e cloranfenicol (20 μg/ml). As colônias obtidas foram novamente selecionadas por PCR utilizando-se o primer senso correspondente a cada gene e o primer reverso AttB2 (5'ACC CAG CTT TCT TGT ACA AAG TGG T 3'). As amostras positivas foram enviadas para sequenciamento.

As seqüência obtidas neste trabalho serão disponibilizadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gen- bank/) após o término de outros experimentos que serão vinculados a este.

2.2 Agroinfiltração dos vetores binários em *Nicotiana benthamiana*

Os vetores obtidos foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe C58C1 por eletroporação plaqueadas em meio LB-Agar contendo os antibióticos gentamicina (10 μg/ml), spectinomicina (50 μg/ml) e rifampicina (25 μg/ml). As colônias novamente foram selecionadas utilizando um primer senso específico de cada gene e o primer reverso AttB2 e sequenciadas para confirmação do fragmento. Todas as analises das sequências foram realizadas pelo programa ApE – *A plasmid Editor* (http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/). Para o ensaio de agroinfiltração, as colônias bacterianas foram inicialmente cultivadas em 5 mL de meio LB liquido a 28°C, durante a noite toda, contendo os antibióticos específicos e posteriormente utilizadas na inoculação de 50ml de meio LB contendo os antibioticos spectinomicina, rifampicina e gentaminina (28°C, noite toda). A suspensão de agrobacteria obtida foi então centrifugada, ressuspendida em 10 mM de MgCl2 e 100 mM de acetoseringona. A solução de cada amostra foi diluída até obter-se 0,5 de densidade ótima (O.D.) a 600 nm. A solução permaneceu incubada entre 2 a 3 horas em temperatura ambiente. As plantas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas e mantidas em casa de vegetação por 2 a 3 dias.

Para os experimentos de co-agroinfiltração entre a proteína CI e as proteínas P3NPipo, Vpg, eIF4E[1] e eIF4E[2], realizou-se a mesma metodologia de obtenção da cultura bacteriana e para preparo da solução a ser agroinfiltrada utilizou-se a proporção 1:1 de cada construção. Os experimentos realizados no trabalho foram repetidos pelo menos 3 vezes.

2.3 Inoculação do LMV-GFP e LMV-mCherry em *N. benthamina* e alface cultivar Trocadero

Foram utilizados para inoculação folhas preservadas pela metodologia descrita por BOS *et al*. (1994). A alface foi inoculada no primeiro par de folhas verdadeiras e duas semanas depois foi realizada a agroinfiltração. Em *N. benthamiana* as amostras foram inoculadas 3 semanas antes da agroinfiltração. Foi utilizado tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 8.0, o abrasivo o carborundum (600 mesh) e carvão vegetal em pó para inoculação das folhas dessecadas. Após inoculação as plantas foram lavadas e mantidas em casa de vegetação. As plantas inoculadas com LMV-GFP foram observadas em lupa binocular (Zeiss) para confirmação da infecção viral.

2.4 Confirmação da fusão proteíca por Western Blot

Para confirmação da fusão das proteínas GFP e RFP no plasmídeo construído foram realizadas várias tentativas de análise por Western Blot. Inicialmente as folhas foram observadas no microscópio confocal para confirmar a localização subcelular das proteínas. As construções que foram examinadas e que obtiveram confirmação no confocal através da fluorescência foram separadas e posteriormente as folhas agroinfiltradas foram extraídas utilizando o tampão LOB contendo β-mercaptoetanol.

As amostras de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as construções VPg-RFP e CI-GFP foram extraídas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas com o reagente Instant Blue (Expedeon – Protein Discovery & Analysis).

Para o ensaio de Western Blot, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Os anticorpos utilizados foram o anti-GFP e anti-VPg, produzidos previamente no laboratório do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Bordeaux, França. Os anticorpos foram adicionados no tampão TTBS (Tris HCl 1M PH: 7,4, NaCl 5M e Tween-20) contendo 0,3% de leite desnatado. Em seguida a membrana permaneceu durante a noite sob agitação a 4°C. Após este período as amostras foram lavadas no tampão TTBS três vezes e em seguida adicionou-se o segundo anticorpo. Incubou-se por 2h sob agitação a temperatura ambiente, e lavou-se a membrana três vezes com o tampão TTBS. Para a revelação, utilizou-se o reagente NBT/BCIP (BioRad).

2.5 Microscopia confocal

As plantas agroinfiltradas tiveram suas folhas observadas no microscópio confocal 2 ou 3 dias após a realização da agroinfiltração, utilizando o equipamento Leica TCS SP2 com os lasers de Argônio e Helio-Neonio. A proteína GFP foi excitada a 488nm e a luz foi capturada entre 525-550. Para as proteínas RFP e mCherry a excitação foi de 543 e a luz foi capturada a 590-630 nm. As imagens foram geradas utilizando o programa Leica LCS.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Através de observações subcelulares *in planta* das proteínas virais P3N-PIPO, VPg e dos fatores de tradução eucarióticos eIF4E^{1} e eIF4E^{2}, de forma isolada e na presença da proteína CI, buscou-se analisar a expressão das proteínas em plantas sadias e infectadas pelo LMV (LMV-mCherry e LMV-GFP). As construções testadas foram VPg-CterRFP, PIPO-NterRFP, 4E^{1}-NterRFP, 4E^{2}-NterRFP e CI-NterGFP, sem nenhuma mutação inserida nas proteínas.

Inicialmente foi testada isoladamente a proteína CI-GFP em alface (*Lactuca sativa* var. Trocadero) e posteriormente as análises foram realizadas somente em *Nicotiana benthamiana*, por esta possibilitar resultados mais rápidos. Através da análise da proteína CI-GFP em alface e fumo sadios, verificou-se a localização desta proteína no citoplasma e núcleo das células vegetais (Figura 2), sendo confirmada a presença no núcleo através da co-agroinfiltração da proteína fibrilarina, usada como controle da localização nuclear.

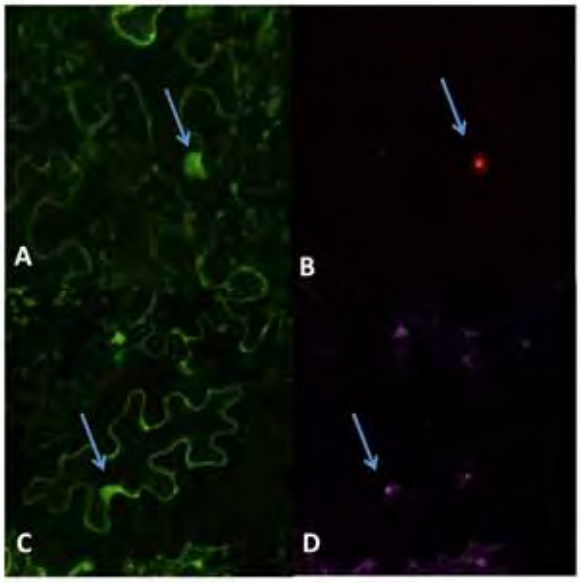

Figura 2 – Localização da proteína CI-GFP: no citoplasma e núcleo das células de *N. benthamiana* (A), localização da proteína fibrilarina (Fib-RFP) no núcleo da célula (B), localização da proteína CI-GFP no citoplasma e núcleo das células de alface Trocadero (C), confirmação da localização nuclear da CI-GFP em alface utilizando a fibrilarina (Fib-RFP) como controle (D). Setas azuis indicam localização no núcleo celular.

Em experimentos de localização da proteína CI do *Turnip mosaic virus* (TuMV), Wei *et al.* (2010) verificaram que em *N. benthamina* sadia, nos estádios iniciais de infecção, a CI encontra-se na parede celular e forma estruturas agregadas no citoplasma, sendo que estas estruturas não foram associadas a localização nuclear. A visualização da CI no núcleo foi somente observada quando uma construção utilizada continha mutação nesta proteína oriunda to *Tobacco etch virus* (TEV) (WEI *et al.*, 2010). Portanto, no patossistema LMV, onde a CI não foi alterada (tipo selvagem), tanto em alface quanto em fumo a localização foi no núcleo e citoplasma.

Porém, quando a CI-GFP foi agroinfiltrada em *N. benthamiana*, previamente infectada com LMV(0)-mCherry, observou-se pontuações da proteína ao longo da membrana celular, além da localização nuclear e citoplasmática verificada anteriormente. Resultados semelhantes foram obtidos por Wei *et al.* (2010), onde pontuações da CI-mRFP do TuMV foi visualizada em fumo infectado por esse mesmo vírus. Segundo este autor, as pontuações estão relacionadas a posição do plasmodesma nas células. Assim, os resultados obtidos indicam que a CI ao interagir com as outras proteínas virais, no caso do LMV-0 testado neste trabalho, é direcionada para o plasmodesma e pode auxiliar no movimento viral.

A co-localização *in planta* entre as proteínas CI-GFP e P3NPIPO-RFP foi observada em *N. benthamiana* sadia e infectada pelo LMV-0, pois há evidências de que a P3N-PIPO, juntamente com a CI, ambas oriundas do *Turnip mosaic virus* (TuMV), coordenem a formação de estruturas cônicas próximo a plasmodesmas, conectando células adjacentes, proporcionando a passagem de partículas virais (WEI *et al*., 2010).

Em fumo sadio verificou-se primeiramente a localização das proteínas separadamente e em conjunto (CI-GFP + P3N-PIPO-RFP). Foi observado que a P3N-PIPO, está localizada no núcleo e na membrana plasmática (Figura 3). Vijayapalani *et al*. (2012), analisando o movimento da proteína P3N-PIPO do TuMV em *N. benthamiana* através de bombardeamento, verificaram que 48h após a introdução do vírus, a proteína expandiu sua localização da membrana plasmática para o citoplasma e possivelmente para o núcleo celular. Já Wei et al (2010), verificaram por agroinfiltração a presença da P3N-PIPO na membrana e plasmodesma, onde a localização das pontuações ao longo da membrana foi confirmada através de uma construção PDLP1-mRFP (plasmodesma).

No experimento da P3N-PIPO-RFP as pontuações ao longo da membrana celular também puderam ser observadas, porém fracamente. Não se observou diferenças significativas na localização das proteínas CI-GFP + P3N-PIPO-RFP agroinfiltradas em fumo sadio ou infectada pelo LMV-0 (mCherry ou GFP) (Figura 3).

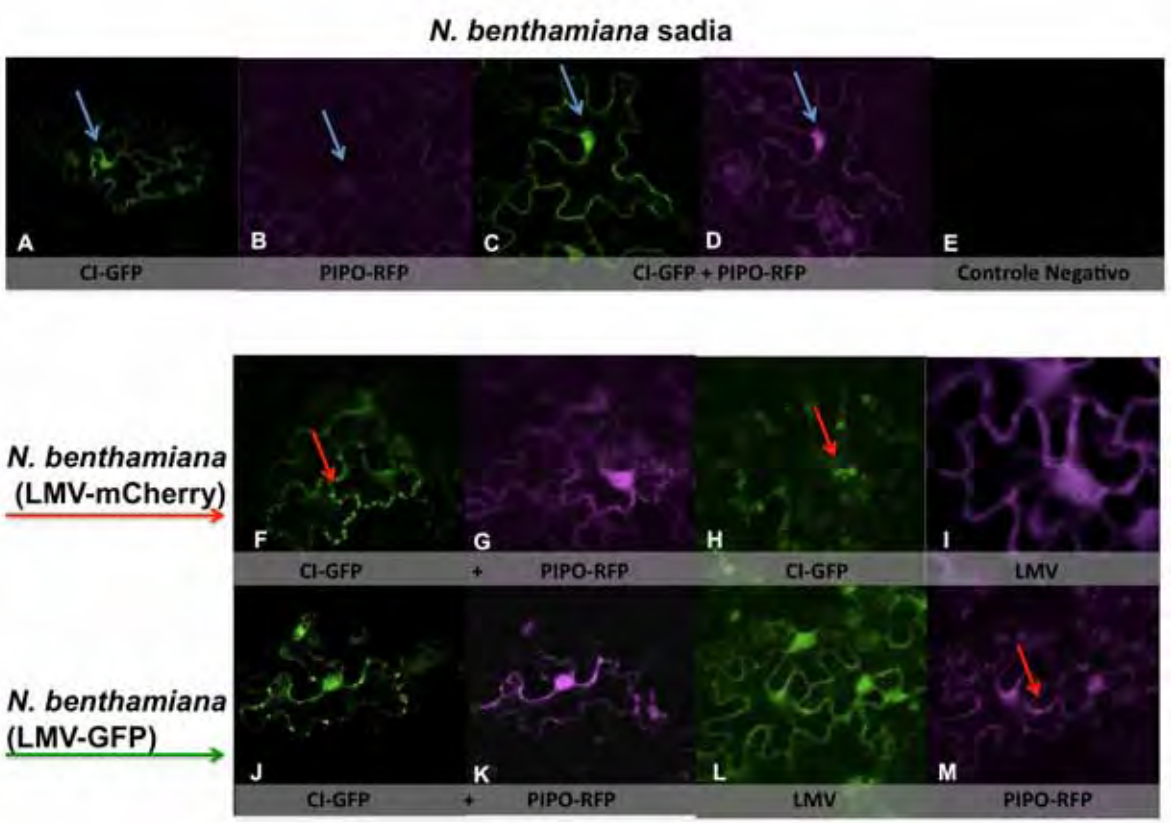

Figura 3 – Localização da proteína CI-GFP no citoplasma e núcleo da célula (3A), Localização da P3N-PIPO-RFP no núcleo e citoplasma (3B), Co-agroinfiltação em fumo com a CI-GFP e P3N-PIPO-RFP (3C-D), Controle negativo da agroinfiltração (3E), Localização da proteína CI-GFP em fumo infectado com LMV-mCherry e na presença da P3N-PIPO-RFP, a seta indica as pontuações ao longo da membrana (3F-G), Localização da CI-GFP na presença do LMV-mCherry (3H-I), Localização da proteína P3N-PIPO-RFP na presença da CI-GFP em fumo infectado pelo LMV-GFP (3J-K), Localização da proteína P3N-PIPO-RFP em fumo infectado pelo LMV-GFP (3L-M). Setas azuis indicam localização no núcleo celular, setas vermelhas indicam pontuações da proteína na membrana celular.

As proteínas virais VPg e CI atuam como determinantes de virulência e devido a sua importância no ciclo viral, foi analisada como ambas são expressas *in planta* de forma isolada e conjunta. Tavert-Roudet *et al.* (2012) verificaram que a região C-terminal da CI (aa 372-643 - CI do LMV-0) interage *in vitro* com a VPg do LMV-0 e LMV-E, porém com intensidades

diferentes, onde na relação das proteínas provenientes do LMV-E foram observadas altos sinais de interação CI-VPg.

Inicialmente foi analisada em fumo sadio a VPg-RFP isoladamente e depois na presença da CI-GFP. A VPg-RFP foi observada restrita ao núcleo e nucléolo das células vegetais (Figura 4), confirmando os resultados obtidos por Rajamaki & Valkonen (2009), onde verificou-se que a VPg do *Potato virus A* encontrava-se nos mesmos locais. Segundo Hiscox (2007), proteínas virais localizadas no núcleo ou nucléolo podem atuar recrutando as proteínas nucleares a fim de facilitar a replicação viral.

Porém, quando a VPg-RFP foi agroinfiltrada com a CI-GFP, tanto em plantas de fumo sadias quanto em infectadas previamente com o LMV-0, observou-se uma distribuição da proteína pelo citoplasma da célula vegetal. O resultado não foi o mesmo quando se retirou a CI-GFP das análises, neste caso a VPg permaneceu restrita ao núcleo e nucléolo (Figura 4). Este resultado pode evidenciar que o direcionamento da VPg para o citoplasma na presença da CI, independentemente da presença do LMV na planta, pode estar relacionado com o recrutamento da VPg pela CI para o movimento célula-a-célula. Porém, outros experimentos devem ser conduzidos para elucidar melhor esta hipótese.

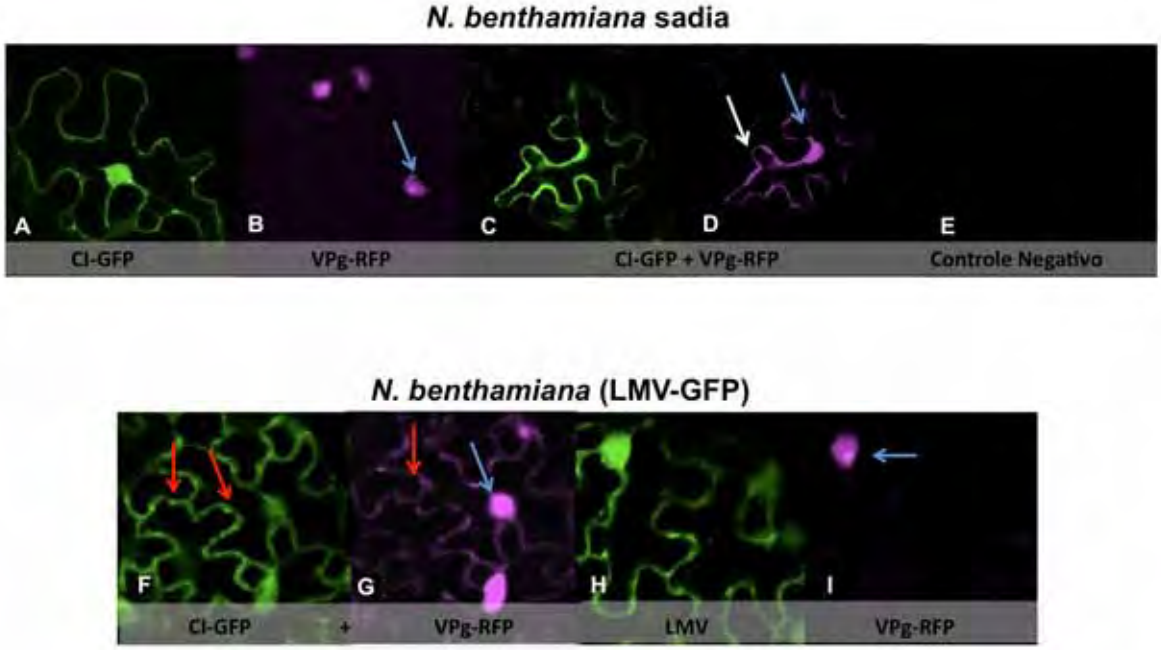

Figura 4 – Localização da proteína CI-GFP no citoplasma e núcleo da célula (4A), Localização da VPg-RFP no núcleo e nucléolo (4B), Co-agroinfiltação em fumo com a CI-GFP e VPg-RFP onde na presença da proteína CI, a VPg passa a localizar-se no citoplasma (4C-D), Controle negativo da agroinfiltração (4E), Localização da proteína VPg-RFP em fumo infectado com LMV-GFP e na presença da CI-GFP, a seta indica as pontuações da CI ao longo da membrana e a localização da VPg no núcleo, nucléolo e citoplasma (4F-G), Localização da VPg-RFP na presença do LMV-GFP (4H-I). Setas azuis indicam localização no núcleo celular, setas vermelhas indicam pontuações da proteína na membrana celular, setas brancas indicam a localização da proteína no citoplasma.

Os experimentos realizados com o eIF4E^{1} e eIF4E^{2}, provenientes de alface, visaram analisar a localização destas proteínas de forma isolada e na presença da proteína CI, em plantas sadias e infectadas pelo LMV-0. Previamente já foi relatado por Tavert-Roudet *et al.* (2012), que a região C-terminal da CI interage com o fator de tradução eucariótico 4E, através de analises de BiFC.

No resultado das observações da localização do eIF4E[1] e eIF4E[2], não foi observada diferença entre a posição dos dois fatores, tanto em plantas sadias quanto em plantas infectadas pelo LMV-0. A presença da CI-GFP também não alterou a localização das proteínas. Os fatores de tradução eucariótico 4E[1] e 4E[2], oriundos de alface, encontram-se localizados no citoplasma e núcleo em todos as interações testadas (Figura 5). Beauchemin *et al.* (2007), analisando a localização subcelular da eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* em *N. benthamiana* verificaram que o eIF(iso)4E concentrava-se ao redor do núcleo e no citoplasma. De acordo com Wang & Krishnaswamy (2012), o eIF4E é preferencialmente uma proteína nuclear, porém em plantas sua localização pode ser dinâmica. Portanto, a diferença da localização no núcleo pode ter ocorrido devido a diferença de interação entre os eIFs e plantas hospedeiras utilizadas.

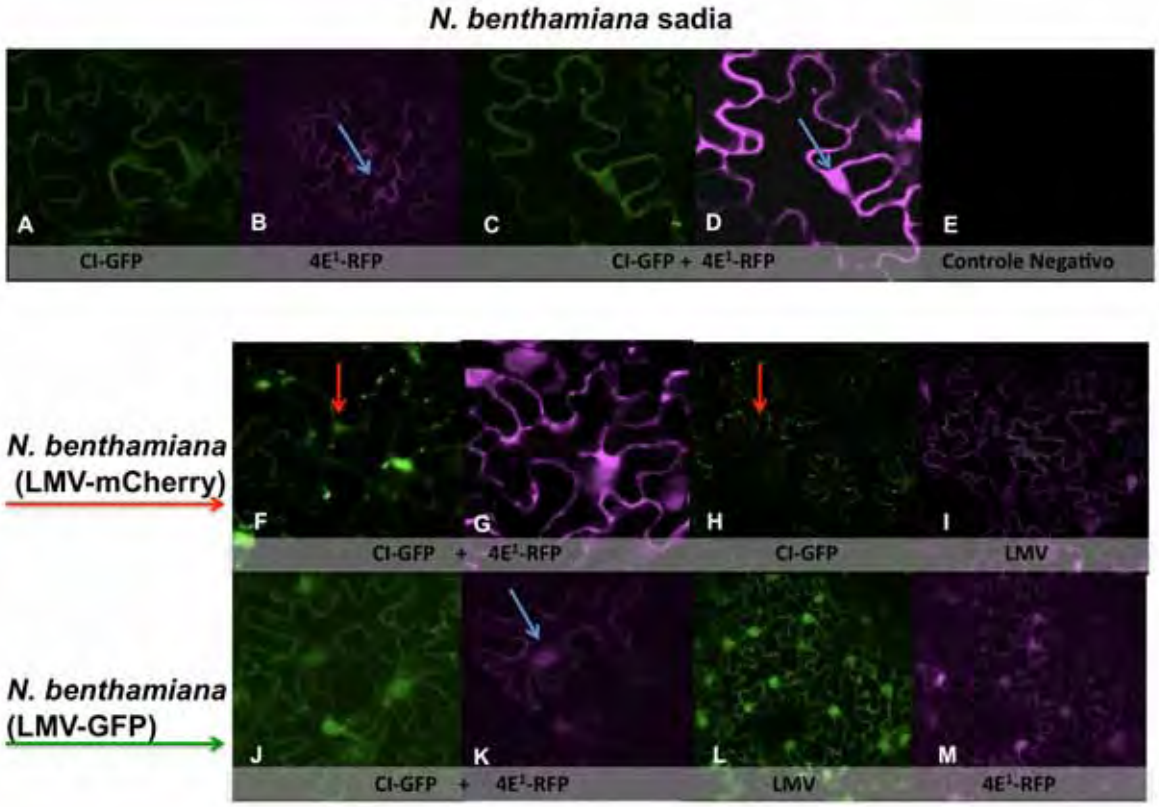

Figura 5 – Localização da proteína CI-GFP no citoplasma e núcleo da célula (5A), Localização do fator 4E[1]-RFP no núcleo e citoplasma (5B), Co-agroinfiltação em fumo com a CI-GFP e P3N-PIPO-RFP (5C-D), Controle negativo da agroinfiltração (5E), Localização da proteína CI-GFP em fumo infectado com LMV-mCherry e na presença da 4E[1]-RFP, a seta

indica as pontuações ao longo da membrana (5F-G), Localização da CI-GFP na presença do LMV-mCherry (5H-I), Localização da proteína $4E^1$-RFP na presença da CI-GFP em fumo infectado pelo LMV-GFP (5J-K), Localização da proteína $4E^1$-RFP em fumo infectado pelo LMV-GFP (5L-M). Setas azuis indicam localização no núcleo celular, setas vermelhas indicam pontuações da proteína na membrana celular.

Nos últimos anos trabalhos importantes de localização e interação entre proteínas virais vem sendo realizados. Várias proteínas dos potyvirus já foram observadas interagindo com diferentes proteínas de plantas, onde a HC-Pro, P3 e VPg, aparentemente são as proteínas virais que mais interagem com as proteínas do hospedeiro (ELENA & RODRIGO, 2012). No caso da proteína capsidial dos potyvirus (CP) já foi observado em microscopia eletrônica uma interação com a proteína CI no plasmodesma das células, sendo ambas proteínas provenientes do *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) (RODRIGUEZ-CEREZO *et al.*, 1997). Já a VPg do LMV interage *in vitro* com o eIF4E de alface (ROUDET-TAVERT *et al.*, 2007). Através da técnica BiFC em *N. benthamiana*, verificou-se que a HC-Pro das espécies *Potato virus A* (PVA), *Potato virus Y* (PVY) e TEV interagiram com o eIF4E de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e batata (*Solanum tuberosum*), sendo esta última interação mais fraca (POIKELA *et al.*, 2011).

Há evidências de que a P3N-PIPO está relacionada com o movimento viral célula-a-célula (WEN & HAJIMORAD, 2010; WEI *et al.*, 2010) e que também interage com proteínas da planta como a PCaP1, onde ambos ancorariam na membrana plasmática e no plasmodesma formando um complexo entre a planta e o vírus (VIJAYAPALANI *et al*., 2012).

A expressão das proteínas fusionadas não puderam ser confirmadas por Western Blot, apesar de várias tentativas terem sido realizadas, porém sem resultado conclusivo. Esta etapa do trabalho está sendo solucionada pela Equipe de Virologia do Institut National de La Recherche Agronomique (INRA) de Bordeaux, através da aquisição de novos antissoros a serem utilizados. Os resultados obtidos neste capítulo são preliminares sendo necessários outros experimentos a fim de elucidar melhor a interação entre as proteínas analisadas no patossistema LMV-planta hospedeira.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RAZZAK, A., GUIRAUD, T., PEYPELUT, M., WALTER, J., HOUVENAGHEL, M. C., CANDRESSE, T., Le GALL, O. & GERMAN-RETANA, S. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against lettuce mosaic potyvirus. Mol Plant Pathol, v.10, p.109–113, 2009.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. Archives of Virology, v.150, p.459-479, 2005.

BEAUCHEMIN, C., BOUTET, N., LALIBERTE, J.F. Visualization of the Interaction between the Precursors of VPg, the Viral Protein Linked to the Genome of Turnip Mosaic Virus, and the Translation Eukaryotic Initiation Factor iso 4E In Planta. Journal of Virology, v.81, n.2, p. 775–782, 2007.

BOS, L. HUIJBERTS, N., CUPERUS, C. Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (Lactuca sativa), and a discussion of resistance terminology. European Journal of Plant Pathology, v 100, p.293-314, 1994.

CHARRON, C. et al. Natural variation and functional analysis provide evidence for coevolution between plant eIF4E and potyviral VPg. The plant Journal, v.54, p.56-68, 2008.

CHUNG, B. Y.-W., MILLER, A.W., ATKINS, J.F., FIRTH, A.E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. PNAS, v.105, n.15, p. 5897–5902, 2008.

ELENA, S.F., RODRIGO, G. Towards an integrated molecular model of plant–virus interactions. Current Opinion in Virology, v.2, p.1–6, 2012.

GAO, Z.H., JOHANSEN, E., EYERS, S., THOMAS, C.L., ELLIS, N., MAULE, A.J. The Potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. Plant J. v.40, p376–385, 2004.

HISCOX, J.A. RNA viruses: Hijacking the dynamic nucleolus. Nat. Rev. Microbiology. v.5, p.119–127, 2007.

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

POIKELA, M.A., GOYTIA, E., HAIKONEN , T., RAJAMAKI, M.L, VALKONEN, J.P.T. Helper Component Proteinase of the Genus Potyvirus Is an Interaction Partner of Translation Initiation Factors eIF(iso)4E and eIF4E andContains a 4E Binding Motif. Journal of Virology, v.85, n.13, p. 6784–6794, 2011.

RAJAMAKI, M.-L., VALKONEN, J.P.T. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein of a picorna-like Potato virus A in Nicotiana species. Plant Cell, v.21, p.2485–2502, 2009.

RODRIGUEZ-CEREZO, E., FINDLAY, K., SHAW, J.G., LOMONOSSOFF, G.P., QUI, S.G., LINSTEAD, P., SHANKS, M., RISCO, C. The Coat and Cylindrical Inclusion Proteins of a Potyvirus Are Associated with Connections between Plant Cells. Virology, v.236, p.296-306, 1997.

ROUDET-TAVERT, G., MICHON, T., WALTER, J., DELAUNAY, T., REDONDO, E., Le GALL, O. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. Journal Gen. Virology, v.88, p.1029 –1033, 2007.

TAVERT-ROUDET, G.; ABDUL-RAZZAK, A.; DOUBLET, B.; WALTER, J.; DELAUNAY, T.; GERMAN-RETANA, S.; MICHON, T.; Le GALL, O.; CANDRESSE, T. The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. Journal of General Virology, v. 93, p.184–193, 2012.

VIJAYAPALANI, P., MAESHIMA, M., NAGASAKI-TAKEKUSHI, N., MILLER, W.A.Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N- PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. PLoS Pathogens, v.8, n.4, 2012.

WANG, A.; KRISHNASWAMY, S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, v.13, n.7, p.795-803, 2012.

WEI, T., ZHANG, C., HONG, J., XIONG, R., KASSCHAU, K.D., ZHOU, X., CARRINGTON, J.C., WANG, A. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. PLoS Pathogens, v.6, n.6 , 2010.

WEN, R.H., HAJIMORAD, M.R. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. Virology, v.400, p.1–7, 2010.